

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

E.A.P. DE MEDICINA VETERINARIA

**Detección serológica de anticuerpos contra Ehrlichia
canis y Ehrlichia Chaffeensis en humanos que realizan
actividades veterinarias en Lima Metropolitana**

TESIS

para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

AUTOR:

Analí Paulino Ruiz

Lima – Perú

2011

AGRADECIMIENTOS

A la Dra Li, por su apoyo, confianza y paciencia...Gracias Doctora!!! ahora entiendo por que le dicen mamá.

A Lucho Hoyos, por el apoyo y tu increíble paciencia, muchas gracias por haber estado pendiente de todo el desarrollo de mi tesis.

Al Dr. Suárez, por haberme apoyado y recibido con una sonrisa cada vez que iba a molestarlo con la “bendita” estadística.

A la Sra. Blanquita y a Carlitos, por recibirme con una sonrisa cada vez que iba a laboratorio (si, también la Sra. Blanquita).

A todos los que colaboraron en el desarrollo de la tesis, Richard, Betty, La Fuana y todos aquellos que no me enteré, pero que estuvieron ahí, gracias!.

Por supuesto a mis queridísimas amigas, por estar siempre ahí, cuando las necesito o cuando solo necesito relajarme... o cuando no las necesito, pero están ahí jeje. Muahz!!!

Para todas, las quiero un montononon.

DEDICATORIA

A Dios por haberme dado lo mejor de mi vida y en realidad lo único que necesito, por protegerme y proteger a mi familia y a todos los que quiero.

A mi padre, por apoyarme siempre en todo, desde lo bueno hasta las cosillas malas jeje. Gracias por ese maravilloso buen humor que siempre tienes y que me enseñaste a tener ante todo, muchas gracias papi, te quiero muchísimo.

A mi madre, por ser mi amiga, consejera, confidente y hasta a veces una piedrita en el zapato, gracias por ser todo eso. Tuviste y tienes la mejor receta para ser la mejor mamá, mil gracias por todo.

A mis hermanos: Erika, gracias por apoyarme, soportarme (aunque a veces o talvez muchas veces pierdas la paciencia) y sobre todo por ser como una segunda mamá, quizás más estricta que la verdadera jeje. También a ti Cesitar, por demostrarme en esos momentos que si eres el hermano mayor jeje.

A ti, por haber estado todo este tiempo a mi lado, por intentar entenderme o por solo cansarte en el intento. Todo sale bien si estamos juntos, recuerdas...

CONTENIDO

	Página.
CONTENIDO	ii
RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
LISTA DE CUADROS	vi
LISTA DE TABLAS	vii
LISTAS DE FOTOS	viii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Ehrlichiosis canina	3
2.1.1. Historia y Distribución geográfica	3
2.1.2. Enfermedades ehrlichiales en caninos	7
2.1.2.1. Ehrlichiosis Monocítica Canina	7
2.1.2.2. Ehrlichiosis Trombocítica Canina	9
2.1.2.3. Ehrlichiosis Granulocítica Canina	10
2.2. Ehrlichiosis Humana	10
2.2.1. Etiología y epidemiología	10
2.2.2. Cuadro clínico	12
2.2.3. Comurrencias	13
2.3. Clasificación Taxonómica de ehrlichia	14
2.4. Patogénesis de Ehrlichiosis canina por <i>E. canis</i>	17
2.4.1. Ingreso y Fase Aguda	17
2.4.2. Fase Subclínica	20
2.4.2. Fase Crónica	21
2.5. Respuesta Inmune frente a <i>Ehrlichia spp.</i>	22
2.5.1. Inmunidad Innata	22
2.5.2. Inmunidad adquirida	24
2.5.2.1. Inmunidad humoral	24
2.5.2.2. Inmunidad celular	25
2.5.3. Inmunopatogenia	26

2.6. Diagnóstico	29
2.6.1. Diagnóstico clínico	29
2.6.2. Diagnóstico laboratorial	31
2.6.3. Diagnóstico serológico	33
2.6.4. Diagnóstico molecular	34
2.7. Ehrlichiosis en el Perú	35
III. MATERIALES Y MÉTODOS	37
3.1 Materiales	37
3.1.1 Lugar y época de ejecución del estudio	37
3.1.2. Tamaño y recolección de muestras	37
3.1.2.1. Criterios de inclusión	38
3.1.2.2. Criterios de exclusión	38
3.1.3 Equipos y materiales	38
3.1.4 Reactivos	39
3.2. Metodología	39
3.2.1. Toma de muestra	39
3.2.2. Procesamiento de las muestras	40
3.2.3. Prueba serológica	40
3.2.4. Interpretación de resultados	41
3.3. Análisis de datos	41
IV. RESULTADOS	42
V. DISCUSIÓN	46
VI. CONCLUSIÓN	49
VII. RECOMENDACIONES	50
VIII. BIBLIOGRAFÍA	51

LISTA DE CUADROS

CUADRO N° 1.

Número y porcentaje de individuos seropositivos a *E. canis* y *E. chaffeensis*,
Lima, 2009. 42

CUADRO N° 2.

Número y porcentaje de individuos varones y mujeres seropositivos a *E.*
canis, Lima, 2009. 42

CUADRO N° 3.

Número y porcentaje de individuos varones y mujeres seropositivos a *E.*
chaffeensis, Lima, 2009. 43

LISTA DE TABLAS

TABLA N° 1.

Especies ehrlichiales zoonóticas que infectan personas y animales domésticos o de laboratorio. 4

TABLA N° 2.

Clasificación taxonómica basada en la secuencia del *gen ARNr 16S*. 16

TABLA N° 3.

Conformación de los genogrupos según publicación realizada por Dumler *et al.* en el 2001. 16

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue determinar la presencia de seropositividad frente a *Ehrlichia canis* (*E. canis*) y *Ehrlichia chaffeensis* (*E. chaffeensis*) en médicos veterinarios o individuos que realizaban actividades veterinarias y que hayan estado en contacto con animales con Ehrlichiosis canina en el distrito de Lima Metropolitana, para lo cual se utilizó muestras de suero sanguíneo de 90 individuos con las características anteriormente mencionadas, 55 varones y 35 mujeres. Los 90 sueros fueron evaluados utilizando inmunofluorescencia indirecta (IFI), utilizando placas que contenían células DH82 (monocitos caninos) infectados con *E. canis* y *E. chaffeensis* además de sueros controles positivo y negativo. Se encontró que 21 (23.33 %) y 18 (20 %) sueros fueron positivos a *E. canis* y a *E. chaffeensis*, respectivamente. Además la seropositividad hallada para *E. canis* en hombres y mujeres fue de 21.8 % (12/55) y 25.7 % (9/35), respectivamente. Asimismo, la seropositividad hallada para *E. chaffeensis* en hombres y mujeres fue de 18.2 % (10/55) y 22.86 % (8/35), respectivamente; encontrando una ligera diferencia entre ambos, pero al igual que para *E. canis*, al realizar la prueba estadística Chi cuadrado, se llegó a determinar que no existe diferencia estadísticamente significativa, por lo tanto la seropositividad hallada es indistinta al sexo. Teniendo en cuenta que es una enfermedad zoonótica emergente y los resultados obtenidos, es recomendable iniciar estudios epidemiológicos y de vigilancia de la Ehrlichiosis en el Perú.

Palabras claves: *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, inmunofluorescencia indirecta, humanos.

ABSTRACT

The goal of the present research was to determinate the presence of seropositivity of *Ehrlichia canis* (*E. canis*) and *Ehrlichia chaffeensis* (*E. chaffeensis*) in veterinaries or subjects involved in veterinary activities and had been exposed to animals with canine ehrlichiosis in Lima, to which it was used 90 samples of serum blood of subjects with the previous characteristics, 55 males and 35 females. The 90 serums were evaluated using indirect immunofluorescence (IIF) using plates with OH82 cells (canine monocytes) infected with *E. canis* and *E. chaffeensis*, and positive and negative controls. It was found that 21 (23,33%) and 18 (20%) serums were positive to *E. canis* and *E. chaffeensis*, respectively. The seropositivity of *E. canis* in males and females was 21,8% (12/55) and 25.7% (9/35), respectively. Moreover, the seropositivity found for *E. chaffeensis* in men and women was 18,2 % (10/55) and 22,86% (8/35), respectively; founding a smooth difference between both, but the same as for *E. canis*, when using Chi square test, no statistic difference was found, therefore the seropositivity found is indistinct to sex. Having in consideration that ehrlichiosis is a emergent zoonotic disease and the results found, is advisable to begin epidemiologic and control researches of ehrlichiosis in Peru.

Key words: *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, indirect immunofluorescence

I. INTRODUCCIÓN

Existen muchas enfermedades transmitidas por garrapatas tanto a animales como a humanos en todo el mundo. Entre las principales se encuentran aquellas producidas por rickettsias del género *Ehrlichia*, dentro del género *Ehrlichia*, cuya especie tipo es *Ehrlichia canis* se encuentran incluidas las especies *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *E. ruminantium* y *E. muris* (Breitschwerdt, 1998).

La ehrlichiosis canina es causada principalmente por el agente *Ehrlichia canis* y es transmitido por un vector artrópodo, *Rhipicephalus sanguineus* o garrapata parda del perro (Parnell, 2004), también se ha demostrado recientemente ser transmitida experimentalmente por la garrapata *Dermacentor variabilis* (Johnson *et al.*, 1998). Existen otras especies que provocan enfermedad en caninos, pero éstas aún no han sido reportadas en nuestro medio. Clínicamente la enfermedad presenta 3 fases, después del período de incubación que es de 8 a 20 días, los perros infectados entran en la fase aguda de la enfermedad que puede durar de 1 a 2 semanas, después continua una fase subclínica de duración variable, donde desaparecen los signos clínicos y finalmente una fase crónica donde encontramos aplasia medular (Waner y Harrus, 2000; Neer, 2000).

La ehrlichiosis ha sido reportada como una enfermedad zoonótica emergente y se han reportado múltiples casos alrededor del mundo. En Sudamérica se ha reportado Ehrlichiosis canina e incluso humana, en países vecinos como, Chile y Venezuela. Respecto a la Ehrlichiosis humana, independientemente de la especie causante, el cuadro clínico puede variar de asintomático a fatal. Sin embargo, se debe reconocer que la ehrlichiosis monocítica humana (EMH) causada por *E. chaffeensis* es la más grave (Maeda *et al.*, 1987; Paddock y Childs, 2003).

En el Perú la ehrlichiosis fue detectada en caninos (ehrlichiosis monocítica canina) a partir de 1982 (Chavera *et al.*, 1982) y desde ahí se han incrementado el número de casos reportados. La enfermedad presenta mayor impacto en la época de verano debido a un incremento en el número de vectores transmisores de la enfermedad.

En el 2002 se encontró una seroprevalencia de 16.5 % en Lima Metropolitana en caninos de distritos colindantes a zonas con aguas naturalmente estancadas (Chorrillos, La Molina y San Juan de Miraflores) en los meses de febrero a mayo del 2001 (Adrianzén *et al.*, 2003) y en 2006 en Sullana - Piura se encontró una seroprevalencia de hasta 76% (San Miguel, 2006). Además, en el 2005 se reportó en el distrito de la Molina un canino con ehrlichiosis granulocítica canina (EGC) esto motivó a sospechar sobre la presencia de otras especies de Ehrlichia, como *Ehrlichia chaffeensis* y/o *Ehrlichia ewingii*, los cuales son patógenos en humanos (Li *et al.*, 2005).

En el Perú se han realizado diversos estudios para hallar seropositividad en individuos a Ehrlichiosis. Se realizó un estudio en individuos con sintomatología sugestiva en el departamento de Ancash, donde se encontró un 9.2 % de seropositividad frente a ehrlichiosis (Anaya *et al.*, 2009), también se realizó un estudio serológico para hallar ehrlichiosis humana causada por *Ehrlichia chaffeensis* utilizando inmunofluorescencia indirecta en las tres regiones del país, Costa (Pampas – Lima), Sierra (Cochapata – Cuzco) y Selva (Cura Mori – Iquitos) encontrando seroprevalencias de 3% (1 de 40), 23% (9 de 40) y 25% (10 de 40) respectivamente (Moro *et al.*, 2009).

Esta enfermedad, dadas las condiciones medioambientales, tiene una alta probabilidad epidemiológica en nuestro medio. Además la presencia de perros con *E. canis* en el Perú suscita la inquietud que los perros puedan actuar como un reservorio de agentes de ehrlichiosis humana en esta región como sucede en Venezuela (Unver *et al.*, 2001). La posibilidad que los perros puedan facilitar la transmisión de esta bacteria a humanos incrementaría su importancia zoonótica (Vinasco *et al.*, 2007).

Por lo tanto la detección serológica de anticuerpos contra *Ehrlichia canis* y *Ehrlichia chaffeensis* (causante de la ehrlichiosis monocítica humana) en humanos que realicen actividades veterinarias y presenten un alto contacto con cánidos con ehrlichiosis, sería de gran utilidad en el campo de la salud pública. De esta manera, se inició la exploración en humanos para detectar seropositividad frente a *Ehrlichia canis* y *Ehrlichia chaffeensis* en nuestro medio, lo cual nos ayudará a posteriores estudios zoonosológicos referentes a medidas de prevención y control.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. EHRLICHIOSIS CANINA

2.1.1. Historia y distribución geográfica actual

La ehrlichiosis es una enfermedad transmitida por garrapatas y causada por parásitos intracelulares obligados del género *Ehrlichia* de la familia Anaplasmataceae los cuales afectan a los animales e incluso, al humano (Tabla N° 1) (Neer, 2000).

La enfermedad se presenta en los países templados, tropicales y subtropicales del mundo en correspondencia con el rango geográfico del hospedero definitivo, la garrapata vector y el agente rickettsial comprometido (Ettinger, 1992).

Se conocen los vectores artrópodos y hospederos animales de muchas especies, pero aún no se aclara la información epidemiológica, incluyendo los posibles animales hospederos, reservorios silvestres o domésticos (Neer, 2000).

En el caso de *Ehrlichia canis* (*E. canis*), su vector artrópodo es la garrapata parda del perro, *Rhipicephalus sanguineus*, con transmisión transtadial estricta. Debido a que no ocurre diseminación trasovárica, la garrapata vector no es un reservorio verdadero (Neer, 2000).

Ehrlichia chaffeensis (*E. chaffeensis*) tiene como vectores a las garrapata *Amblyoma americanum* (Parnell, 2004) y *Dermacentor variabilis* (Neer, 2000). Esta bacteria puede causar signos de la enfermedad en los perros, indistinguibles de la infección por *E. canis* (Waner y Harrus, 2000), además, puede infectar tanto a perros como a humanos (Neer, 2000).

TABLA N° 1 Especies ehrlichiales que infectan personas y animales domésticos o de laboratorio.

Especie (enfermedades)	Distribución geográfica	Vector	Leucocitos infectados	Hospedero infectado en forma natural	Hospedero infectado experimentalmente
Monocítica					
<i>E. canis</i> (Ehrlichiosis Monocítica canina)	Mundial, tropical y templado	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Células mononucleares, linfocitos	Canidae	Ninguno
<i>E. chaffeensis</i> (erlichiosis monocítica humana)	EUA (principalmente el sur)	<i>Amblyomma americanum</i> , <i>Dermacentor variabilis</i>	Células mononucleares, neutrófilos, linfocitos	Humanos, perros, venados	Perro, venado de cola blanca, ratones de pata blanca
<i>E. sennetsu</i> (actualmente <i>Neorickettsia sennetsu</i>) ^a	Occidente de Japón, Malasia	?	Células mononucleares	Humanos	Ratones, perros, primates no humanos
<i>E. risticii</i> (actualmente <i>Neorickettsia risticii</i>) ^b	EUA, Canadá	?	Monocitos	Caballos	Perros, gatos, ratones, primates no humanos
Granulocítica					
<i>E. ewingii</i> (ehrlichiosis granulocítica canina)	EUA	<i>A. americanum</i> ?, <i>Otobius megnini</i> ?	Neutrófilos, eosinófilos	Perros	?
<i>E. equi</i> [*] (ehrlichiosis granulocítica canina)	EUA (costa occidental)	<i>Ixodes pacificus</i>	Neutrófilos, eosinófilos	Caballos, perros, humanos, llamas	Burros, ovejas, perros, cabras, gatos, primates no humanos
Agente de la ehrlichiosis granulocítica humana (<i>E. microti</i> ?)	EUA (medio oeste alto, noreste)	<i>I. scapularis</i> (norte)	Neutrófilos	Humanos, caballos, perros, ratones de pata blanca, ardillas listadas, ratones campestres	Ratones, venados
<i>E. phagocytophila</i> [*] (fiebre transmitida por garrapata)	Gran Bretaña, Europa, África, Asia	<i>I. ricinus</i>	Neutrófilos, eosinófilos, monocitos	Ovejas, ganado, visones, perros, venados, llamas, humanos	Cobayos, ratones
Trombocítica					
<i>E. platys</i> (actualmente <i>Anaplasma platys</i>) ^c	Sur de EUA, sur de Europa, Australia ^c	<i>R. sanguineus</i> ?	Plaquetas	Perros	Perros
Otros					
<i>Cowdria ruminantium</i> (actualmente <i>Ehrlichia ruminantium</i>) ^d	África sub-Sahara	<i>A. hebraeum</i>	Células endoteliales, macrófagos neutrófilos	Ganado	Perros
? = incierto					
^{a, b, c, d} Actual denominación (Dumler <i>et al.</i> , 2001)					
^e Según informes de Irwin, P. J. en el 2001 en el artículo "The first report of canine ehrlichiosis in Australia"					
[*] Estas tres especies actualmente se encuentran dentro de la especie <i>Anaplasma phagocytophilum</i>					

Tomado de Neer, 2000 y Dumler *et al.*, 2000.

Existen referencias de la presencia de la ehrlichiosis en casi todo el mundo. Durante la década de los 40, se describieron casos de ehrlichiosis canina en distintos países del centro y sur de África y en la India (Ewing, 1969).

Ehrlichia canis fue identificada por primera vez en el año 1935, en el Instituto Pasteur de Argelia por Donatien y Lestoquard, tras observar que algunos perros alojados en sus instalaciones e infestados por garrapatas desarrollaban ocasionalmente un proceso febril agudo que cursaba con anemia. En las extensiones sanguíneas de los perros afectados, observaron unos pequeños microorganismos en el interior de los monocitos, creyendo en un principio que se trataba de alguna especie de *Rickettsia*. Inicialmente el microorganismo recibió el nombre de *Rickettsia canis* (Donatien y Lestoquard, 1935; Ewing, 1969). Moshkovskii sustituyó en 1945 ese nombre por el actual de *Ehrlichia canis*, como reconocimiento a Paul Ehrlich, gran biólogo alemán (Moshkovski, 1945).

En Europa, Donatien y Lestoquard (1935) la reportaron en el sur de Francia; mientras que en América se tuvo noticias de la enfermedad a partir del año 1957, cuando los investigadores Bool y Suttmöller la detectaron en perros de la isla de Aruba (Boll y Sutmoller, 1957) y en 1962 aparece la primera descripción de *Ehrlichia canis* en Estados Unidos en el estado de Oklahoma (Ewing, 1963; Ettinger, 1992).

En la década de los 60, perros militares británicos sufrieron en Singapur un cuadro agudo de etiología desconocida (Wilkins *et al.*, 1967). Poco después, un proceso de características similares apareció en la población canina americana destacada en Vietnam. La enfermedad cursaba con manifestaciones hemorrágicas graves, pancitopenia y emaciación, causando un elevado número de muertes en estas poblaciones (Keefe *et al.*, 1982). El proceso, debido a las dudas surgidas en cuanto a su etiología, recibió diferentes nombres, tales como rickettsiosis canina, tifus canino, fiebre hemorrágica canina, síndrome hemorrágico idiopático, enfermedad del perro de rastreo y pancitopenia tropical canina, si bien el más aceptado fue éste último (Penissi, 1989). A pesar de que la ehrlichiosis era conocida desde la década de los 30, los investigadores intensificaron su atención en ella tras la aparición de estos brotes epizooticos en perros de las fuerzas armadas y el posterior cultivo de *E. canis* (Huxsoll, 1990).

En 1971, Ewing *et al.*, hallaron otro tipo de *Ehrlichia* en perros, la cual parasitaba principalmente los granulocitos, y que parecía idéntica a la que afectaba a los caballos, conocida como *Ehrlichia equi*. Sin embargo, en 1992 fue admitida como una especie diferente y se la denominó *Ehrlichia ewingii* (Anderson *et al.*, 1992).

En 1978, fue descrita otra *Ehrlichia* que parasitaba las plaquetas de los perros, y que producía en ellos trombocitopenia cíclica infecciosa, (Harvey *et al.*, 1978) denominándola *E. platys*, actualmente denominada *Anaplasma platys* (*A. platys*) (Dumler *et al.*, 2001).

En Chile, en octubre de 1998 se describió el primer caso de ehrlichiosis canina, causado por *E. canis* y transmitida por el vector *Rhipicephalus sanguineus* en un canino que presentaba decaimiento, inapetencia, dificultad respiratoria y con antecedentes de infestación con garrapatas. El diagnóstico clínico fue confirmado en Alemania por inmunofluorescencia indirecta (López *et al.*, 1999). Desde ese año hasta la fecha, se ha incrementado el número de casos en toda la Región Metropolitana, constituyéndose hoy en día en una enfermedad cada vez más común, en los meses de primavera y verano en los perros (López *et al.*, 2003).

En Brasil, *E. canis* fue identificada por primera vez por técnicas de PCR (Dagnone *et al.*, 2003). Estudios epidemiológicos han puesto de manifiesto la prevalencia de rickettsiosis de 4.8% - 65% en perros de las zonas urbanas o rural, encontrándose que el 4.8% corresponde a *E. canis* (Saito *et al.*, 2008) y en un estudio en el 2009 se encontró un 40% (28/70) de los perros con sintomatología de ehrlichiosis contenían ADN de *E. canis* en su sangre (Ueno *et al.*, 2009).

En el Perú, se han realizado varios estudios, encontrándose desde los factores de riesgo de la ehrlichiosis canina (Contreras *et al.*, 2009), hasta artículos donde se describe una nueva cepa de *E. canis* identificada en perros peruanos usando técnicas de PCR, remarcando así la importancia de la ehrlichiosis como una infección emergente en el Perú (Moro *et al.*, 2009). Además, en el 2003, un estudio encontró una seroprevalencia de 16.5% para ehrlichiosis canina mediante un estudio en tres distritos de Lima utilizando la técnica indirecta de ELISA en animales expuestos a este agente (Adrianzen *et al.*, 2003).

Es sorprendente la rapidez, con la cual se ha difundido y se han reportado casos de la enfermedad, en los últimos años. Hoy en día, continúan reportándose en Los Estados Unidos, Canadá, Europa, Asia, América de Sur y África (Laboratorios Arriaga, 2004).

2.1.2. Enfermedades ehrlichiales en caninos

2.1.2.1. Ehrlichiosis monocítica canina (EMC)

La ehrlichiosis monocítica canina (EMC) es una enfermedad infecciosa causada por el organismo rickettsial *Ehrlichia canis* (Bothelo *et al.*, 2004). La enfermedad es también conocida como rickettsiosis canina, fiebre hemorrágica canina, enfermedad del perro rastreador, tifus de la garrapata canina y pancitopenia tropical canina, nombres que representan diferentes aspectos de una misma enfermedad (Waner y Harrus, 2000).

Los huéspedes vertebrados de *E. canis* se han limitado a miembros de la familia Canidae; además del perro doméstico, se consideran huéspedes reservorios el coyote, el zorro y el chacal (Neer, 2000).

El vector principal de *E. canis* es la garrapata parda del perro, *Rhipicephalus sanguineus* (Neer, 2000), pero recientemente se ha demostrado la transmisión experimental de la enfermedad por *Dermacentor variabilis* (Johnson *et al.*, 1998; Waner y Harrus, 2000). Como la transmisión de la *Ehrlichia* es mecánica y no biológica, las transfusiones de sangre infectada pueden también transmitir la rickettsia. (Ettinger, 1992; Waner y Harrus, 2000; Neer, 2000).

El curso de la enfermedad se ha dividido en tres fases: aguda, subclínica y crónica, basándose en los signos clínicos y las anomalías clínico patológicas (Codner y Farris-Smith, 1989; Neer, 2000).

La fase aguda se inicia después de un periodo de incubación de 8 – 20 días y dura de dos a cuatro semanas (Neer, 2000). La sintomatología es inespecífica y consiste en depresión, anorexia, fiebre, pérdida de peso, descargas oculares y nasales, disnea, tos y edema de extremidades o escroto (Ettinger, 1992; Neer, 2000; Waner y Harrus, 2000). La fase aguda suele resolverse en forma espontánea y a continuación se inicia la fase subclínica (Neer, 2000).

La fase subclínica se caracteriza por la ausencia de sintomatología, clínicamente el animal parece normal (Neer, 2000). El recuento de eritrocitos generalmente se normaliza (Buhles, *et al.*, 1974) pero se puede encontrar la presencia de alteraciones hematológicas (Codner y Farris-Smith, 1989; Ettinger, 1992) consistentes en trombocitopenia, anemia arregenerativa y respuesta celulares variables de leucopenia a linfocitosis y monocitosis (Ettinger, 1992). Su duración en infecciones naturales puede ser de hasta 5 años (Codner y Farris-Smith, 1989). Si los animales

infectados son competentes eliminaran la *E. canis*, de no ser así, se presentará la fase crónica de la enfermedad (Neer, 2000).

En la fase crónica las muestras clínicas comunes de la enfermedad crónica son debilidad, depresión, anorexia, pérdida crónica de peso y emaciación, membranas mucosas pálidas, fiebre y edema periférico, especialmente de los miembros traseros y del escroto (Ettinger, 1992; Waner y Harrus, 2000). Sangrado relacionado a la trombocitopenia, como petequias y equimosis dérmicas y de membranas mucosas así como epistaxis son hallazgos frecuentes (Waner y Harrus, 2000).

El diagnóstico de la EMC se basa en la sintomatología clínica, cuadro hematológico y se confirma con las pruebas de laboratorio. El cuadro clínico de la ehrlichiosis canina es totalmente inespecífico, su sintomatología puede aparecer en numerosas enfermedades y no siempre aparecen conjuntamente en el curso de la EMC (Ettinger, 1992).

En el cuadro hematológico, el hallazgo más común en la EMC en todas sus etapas es la trombocitopenia (Ettinger, 1992; Neer, 2000). En la fase aguda de la enfermedad es común la leucopenia y la anemia moderada (usualmente normocítica, normocrómica, no regenerativa). En la fase subclínica se observa generalmente una trombocitopenia moderada, pudiendo haber un descenso en el número de los neutrófilos; los parámetros eritrocíticos no son afectados normalmente en esta etapa de la enfermedad. La trombocitopenia severa, leucopenia y anemia se presentan más comúnmente durante la fase crónica de la EMC (Waner y Harrus, 2000). La pancitopenia severa es la característica de la fase crónica grave y que ocurre como resultado de una médula ósea hipocelular suprimida (Ettinger, 1992; Waner y Harrus, 2000).

El examen serológico mediante Inmunofluorescencia Indirecta del anticuerpo (IFA) usando antígenos de *E. canis* constituye el método de elección (Cadman *et al.*, 1994). La presencia de títulos de anticuerpos anti *E. canis* a una dilución mayor a 1:40 se considera evidencia de exposición. Se ha señalado la existencia de reacciones cruzadas entre *E. canis*, y *E. ewingii*, *E. equi* o *E. risticii* (Waner y Harrus, 2000).

Otros métodos, usados principalmente en investigación, son el cultivo del parásito, PCR y Western immunoblotting. El diagnóstico se confirma con la detección de anticuerpos en suero contra *E. canis*, la demostración del ADN de *E. canis* mediante la reacción de cadena de polimerasa (PCR), o con la visualización de las mórulas en los monocitos circulantes Sin

embargo aproximadamente sólo el 4% de los casos durante la fase aguda de la enfermedad revelan la típica mórula (Waner y Harrus, 2000).

2.1.2.2. Ehrlichiosis trombocítica canina (ETC)

La ehrlichiosis trombocítica canina (ETC) o trombocitopenia cíclica infecciosa canina, es producida por la *Ehrlichia platys* (actualmente *A. platys*) (Yu *et al.*, 2000; Dumler *et al.*, 2001). Esta *Ehrlichia* infecta exclusivamente plaquetas, no habiéndose encontrado en otro tipo de células (Ettinger, 1992). La identificación de este microorganismo se publicó por primera vez en Estados Unidos (Harvey, 2000) y posteriormente en Grecia (Kontos *et al.*, 1991), sur de Francia (Beaufils *et al.*, 2002) y Venezuela (Arraga – Alvarado *et al.*, 2003).

Se considera que la infección por este agente es específica del perro. La transmisión de la infección se produce a través de la picadura de garrapatas de la especie *Rhipicephalus sanguineus* u otras garrapatas (Arraga - Alvarado *et al.*, 1997), las transfusiones sanguíneas con sangre infectada también podrían transmitir la infección (Breitschwerdt, 2003).

La infección es a menudo inaparente, pero tras una incubación de 8 a 15 días, puede producirse fiebre, adenopatía generalizada, leucopenia, anemia moderada, hipergammaglobulinemia moderada, hipoalbuminemia, y especialmente trombocitopenia, ésta trombocitopenia se sucede en episodios de 3-4 días y a intervalos de 7-21 días, de ahí que a la enfermedad se le haya denominado “Trombocitopenia cíclica infecciosa del perro. A pesar de la disminución del número de plaquetas, es rara la aparición de hemorragias espontáneas (Harrus *et al.*, 1997).

Las cepas griega e israelita son más agresivas y producen un cuadro caracterizado por fiebre elevada (41,5 °C), anorexia, apatía, debilidad, palidez de mucosas y hemorragia (petequias en mucosas y lesiones hemorrágicas cutáneas) (Kontos *et al.*, 1991).

El diagnóstico se basa principalmente en las alteraciones hematológicas (trombocitopenia y algunas veces anemia), alteraciones bioquímicas (hipoalbuminemia), identificación del microorganismo en frotis sanguíneo, especialmente en el primer episodio de la trombocitopenia cíclica, inmunofluorescencia indirecta para anticuerpos (IFA) y técnicas moleculares (PCR) (Parnell, 2004).

2.1.2.3. Ehrlichiosis granulocítica canina (EGC)

La ehrlichiosis granulocítica canina es causada por *Ehrlichia ewingii*, este agente infecta neutrófilos y más raramente eosinófilos caninos (Ettinger, 1992).

La garrapata vector es *Amblyoma americanum* (Wolf *et al.*, 2000), de distribución exclusiva en los Estados Unidos por lo que esta infección se considera restringida a esta área geográfica (Anderson *et al.*, 1993, Murphy *et al.*, 1998). Sin embargo, recientemente se ha observado la infección natural de este agente en otras especies de garrapatas como, *Rhipicephalus sanguineus* y *Dermacentor variabilis* en Oklahoma (Murphy *et al.*, 1998).

La enfermedad puede cursar sin sintomatología o presentar un cuadro leve con signos variados, caracterizado en general por fiebre, letargia anorexia y pérdida de peso. Con cierta frecuencia se presenta con poliartritis neutrofílica e incluso con signos neurológicos como ataxia, paresia (Goldman *et al.*, 1998). La alteración hematológica más frecuente es trombocitopenia (Goldman *et al.*, 1998, Neer, 2000)

Es posible detectar reactividad cruzada entre especies ehrlichiales, los anticuerpos a *E. ewingii* reaccionan en forma cruzada con *E. canis* y *E. chaffeensis* (Neer, 2000, Wolf *et al.*, 2000). Como no es posible cultivar *E. ewingii* más allá del aislamiento en células primarias; por consiguiente, no se dispone de una prueba serológica específica (Neer, 2000)

En 1999, Buller *et al.* publicó la evidencia de *E. ewingii* en seres humanos, utilizando técnicas de PCR. Esta enfermedad puede ser clínicamente indistinguible de la infección causada por *E. chaffeensis* o el agente de la ehrlichiosis granulocítica humana (Buller *et al.*, 1999)

2.2. EHRlichiosis HUMANA

2.2.1. Etiología y epidemiología

En 1953 fue descubierto el primer agente ehrlichial en humanos en Japón por Misao y Kobayashi, al cual se le asignó el nombre de *Ehrlichia sennetsu* (Misao y Kobayashi, 1955). El síndrome producido por este agente fue llamado fiebre de Sennetsu, el cual es semejante a la mononucleosis. Esta especie se encuentra filogenéticamente relacionada con *Ehrlichia risticii*, causante de la fiebre equina del Potomac y de algunas infecciones en perros (Dumler *et al.*, 2001; López *et al.*, 2003).

En 1986, la ehrlichiosis humana fue diagnosticada por primera vez fuera de Asia, en los Estados Unidos, en un paciente con sintomatología compatible con Fiebre de las Montañas Rocosas. Este paciente fue negativo serológicamente a *Rickettsia rickettsii* y dos semanas antes había estado en Arkansas expuesto a picaduras de garrapatas, se le realizó un análisis y se evidenció la presencia de un agente muy relacionado con *E. canis* (Maeda *et al.*, 1987); mientras que en 1990, con motivo de prácticas militares que realizaban en Fuerte Chaffee, Arkansas Occidental, quince miembros de la Guardia Nacional del Estado de Iowa presentaron síntomas parecidos a una rickettsiosis humana transmitida por garrapatas, denominada Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas; los organismos causantes fueron aislados e identificados como una nueva especie de *Ehrlichia*, a la que se denominó *E. chaffeensis* (Dawson *et al.*, 1991; Anderson y Dawson, 1991), la cual es capaz de infectar a los perros de manera natural y dar lugar a una enfermedad grave, serológicamente indistinguible de la causada por *E. canis* o *E. ewingii* (Breitschwerdt *et al.*, 1998; Waner y Harrus, 2000).

En Venezuela, un país tropical donde la ehrlichiosis es una enfermedad endémica en perros y caballos, se reportó en una niña de 17 meses el primer caso de ehrlichiosis humana (Arraga, 1994) y posteriormente en 1996, mediante el test de IFI se detectaron anticuerpos de *E. chaffeensis* (Arraga *et al.*, 1996).

En 1994, en el norte de Minnesota y Wisconsin se identificó una segunda especie, la cual infecta principalmente a células de la serie granulocítica y que causa la llamada ehrliquiosis granulocítica humana (Chen *et al.*, 1994).

También en 1994, en Venezuela, el microorganismo se detectó por primera vez en frotis sanguíneo de seres humanos. En el citoplasma de plaquetas se identificaron mórulas con características morfológicas semejantes a las observadas en plaquetas de caninos que se estudiaron conjuntamente; el microorganismo se notificó como *Ehrlichia platys* (Tamí, *et al.*, 1994).

En 1996 se reportó infección asintomática por un agente semejante a *Ehrlichia canis* en un hombre venezolano. Se aísla y realiza caracterización antigénica y genética del agente (Pérez *et al.*, 1996).

En 1999, nuevamente en EEUU, se encontró un tercer agente, *Ehrlichia ewingii*, ya conocida en el campo veterinario, también causante de ehrliquiosis granulocítica humana (Buller *et al.*, 1999).

En una publicación realizada por Tamí en el 2002, se informó de la detección de mórulas en plaquetas mediante el examen de frotis sanguíneo de dos pacientes con un cuadro clínico compatible con la enfermedad. La identificación del ADN del microorganismo, por medio de la PCR, proporcionó las bases para pensar que se había identificado en el país una nueva especie propia del ser humano, similar a *Ehrlichia platys* en caninos (Tamí, 2002).

Además, en el año 2006, en una clínica en el estado de Lara, Venezuela, 20 pacientes con signos clínicos compatibles de ehrlichiosis, fueron estudiados, encontrando los siguientes resultados: el 30% de los pacientes fueron positivos para *Ehrlichia canis*, mediante PCR utilizando el gen *ARNr 16S*. Al compararlas con las cepas de EE.UU, las secuencias de genéticas del ARNr 16S de los seis pacientes tuvieron la misma mutación presente en la cepa de *E. canis* causante de la ehrlichiosis humana venezolana (EHV) previamente aislada de un humano asintomático. Este estudio es el primer reporte de infección por *E. canis* en pacientes humanos con signos clínicos de HME (Pérez *et al.*, 2006).

2.2.2. Cuadro clínico

El cuadro clínico de la ehrlichiosis humana es bastante inespecífico y se caracteriza por fiebre, escalofríos, malestar general, cefalea, mialgias, náuseas, vómitos, anorexia y pérdida de peso (Perterson *et al.*, 1989; Eng *et al.*, 1990; Brooks *et al.*, 1998). Posteriormente, aparece linfadenopatía y en un 30% de los casos se describen erupciones cutáneas y sintomatología digestiva. También se pueden observar cuadros neurológicos y respiratorios según la gravedad del proceso (Eng *et al.*, 1990; Rohrbach *et al.*, 1990; Bakken and Dumler, 2000). Las manifestaciones clínicas son muy similares a las de fiebre manchada de las Montañas Rocosas pero sin la presencia de exantema (Brooks, 1998).

Independientemente de la especie causante de la ehrlichiosis, el cuadro clínico puede variar de asintomático a fatal. Sin embargo, se debe reconocer que la ehrlichiosis monocítica humana (EMH) causada por *E. chaffeensis* es la más grave (Maeda *et al.*, 1987; Fishbein *et al.*, 1994; Paddock y Childs, 2003). Esta enfermedad se ha asociado con síndrome de dificultad respiratoria grave en adultos y meningoencefalitis incluso en pacientes inmunocompetentes (Vugia *et al.*, 1996; Patel *et al.*, 1999), si bien es en pacientes con la inmunidad comprometida donde la enfermedad es mucho más grave, incluso mortal (Paddock *et al.*, 1993; Marty *et al.*, 1995; Sadikot *et al.*, 1999).

A nivel de laboratorio se observa trombocitopenia, leucopenia y anemia (Eng *et al.*, 1990; Bakken *et al.*, 1996).

2.2.3. Conurrencias

La existencia de una alteración previa del sistema inmune o la presentación de enfermedades concomitantes, principalmente enfermedades que inmunocomprometen al individuo, en personas previamente infectadas por *Ehrlichia spp.* pueden generar la aparición del cuadro clínico o acrecentar la gravedad del mismo (Wong y Thomas, 1998).

La primera concurrencia entre infección por SIDA y *E. chaffeensis* fue descrita en 1993, otras descripciones posteriores han sido reportadas esporádicamente (Paddock *et al.*, 1993). La infección por *E. chaffeensis* en personas infectadas con el virus del SIDA suele ser mortal (Paddock *et al.*, 1993; Paddock *et al.*, 1997).

Entre 1992 y 2000, 21 pacientes con SIDA fueron diagnosticados de ehrlichiosis, 17 de ellos en los EEUU entre 1997 y 2000 (Paddock *et al.*, 2001). El diagnóstico de la ehrlichiosis en personas infectadas por SIDA se ve dificultado por la similitud del cuadro clínico de ehrlichiosis con la sintomatología propia de las complicaciones de la enfermedad. En la población infectada exclusivamente por SIDA es frecuente encontrar alteraciones hematológicas como citopenias, lo que supone que los hallazgos hematológicos, considerados significativos de ehrlichiosis en la población normal, sean más sutiles y más sujetos a confusión en los individuos afectados por el SIDA (Sloand *et al.*, 1992; Everett *et al.*, 1994).

E. ewingii también ha sido asociada con enfermedad principalmente en personas inmunodeprimidas (Buller *et al.*, 1999).

Se han diagnosticado infecciones concurrentes de ehrlichiosis granulocítica humana (EGH) y otras enfermedades transmitidas por garrapatas como la enfermedad de Lyme (Bakken *et al.*, 1996), por lo que se puede dar el caso de que coexistan más de una enfermedad en el paciente picado por garrapatas y observarse manifestaciones clínicas de más de una de ellas (Thomas *et al.*, 2001). Debido a ello, parece lógico que las áreas geográficas donde se ha descrito la EGH se corresponden estrechamente con las zonas endémicas de enfermedad de Lyme (Dumler *et al.*, 1995; Kitron *et al.*, 1997).

2.3. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE EHRLICHIA

El género *Ehrlichia* se designó como tal en 1945 en honor a Paul Ehrlich (Moshkovski, 1945).

En 1957, Philip reagrupa los géneros *Ehrlichia* (especie tipo *Ehrlichia canis*), *Cowdria* y *Neorickettsia* en la tribu *Ehrlichieae* (familia *Rickettsiaceae*, orden *Rickettsiales*) (Ristic y Kreier, 1957). En 1980, la nomenclatura de *Ehrlichieae*, *Ehrlichia* y *Ehrlichia canis* es incorporada a la Lista aprobada de nombres bacterianos, lo que les confiere el estatus de nomenclaturas públicamente válidas.

En el 2000, Neer clasificó las especies ehrlichiales de acuerdo a sus células blanco, existiendo algunas especies que tenían más de una célula blanco, tales como *E. chaffeensis*, *E. risticii* y *E. phagocytophila*. La clasificación fue de la siguiente manera:

- Cepas monocitotrópicas
 - *Ehrlichia canis*
 - *Ehrlichia chaffeensis*
 - *Ehrlichia sennetsu*
 - *Ehrlichia risticii*
 - *Ehrlichia bovis*
- Cepas granulocitotrópicas
 - *Ehrlichia ewingii*
 - *Ehrlichia equi*
 - *Ehrlichia phagocytophila*
 - Agente de la ehrlichiosis granulocítica humana (AEGH)
- Cepas trombocitotrópicas
 - *Ehrlichia platys*
- Otros
 - *Cowdria ruminantium*

La clasificación taxonómica clásica se basaba en las características morfológicas, ecológicas y epidemiológicas de las bacterias y en las manifestaciones clínicas de la enfermedad que producen (Dumler *et al.*, 2001).

Ningún sistema de clasificación microbiológica es perfecto. Sin embargo, la clasificación genética de los microorganismos es óptima en lo que se refiere a su capacidad de predecir los comportamientos biológicos y la enfermedad producida por los agentes infecciosos incluidos en el mismo grupo (Dumler *et al.*, 2001).

Las enfermedades ehrlichiales que se dividían de acuerdo a sus células blanco, actualmente se clasifican por genogrupos, construyéndose un árbol filogenético (Parnell, 2004).

Basándose en los resultados obtenidos de las secuencias del gen 16S rRNA y *groESL* y de los análisis antigénicos (Sumner *et al.*, 1997), Dumler *et al.*, 2001), en un artículo publicado en el International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology proponen una reorganización de estas especies a través de la eliminación de las tribus de la familia *Rickettsiaceae* y la incorporación de las especies de la anteriormente denominada tribu *Ehrlichieae* a la familia *Anaplasmataceae*. Así los géneros: *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Cowdria* y *Neorickettsia* se incorporan a la Familia *Anaplasmataceae* dentro del orden *Rickettsiales* y del Filum *Proteobacteria*.

Basándose en la secuencia del gen 16S rRNA, las especies anteriormente incluidas en los géneros *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Cowdria* y *Neorickettsia* se reorganizarían en cuatro grupos genéticos (Tabla N° 2), a su vez agrupados en 3 distintos grupos genéticos (genogrupos) (Tabla N° 3) (Dumler *et al.*, 2001).

Existe una elevada reacción antigénica cruzada entre las especies del mismo grupo, ya que comparten varios antígenos superficiales homólogos; sin embargo, entre las especies de los diferentes grupos esta reacción antigénica cruzada es mucho menor (Yu *et al.*, 2000; Dumler *et al.*, 2001).

El nuevo genogrupo de *Ehrlichia*, excepto por *E. Ewingii* y *E. ruminantium*, infecta monocitos y macrófagos. *E. ewingii* infecta granulocitos y *E. ruminantium* células del endotelio vascular y neutrófilos. El grupo del género *Anaplasma* infecta granulocitos, plaquetas y glóbulos rojos. El grupo *Neorickettsia* infecta monocitos y macrófagos. *Neorickettsia risticii* adicionalmente infecta células del epitelio intestinal y mastocitos (Dumler *et al.*, 2001)

TABLA N° 2: Clasificación taxonómica basada en la secuencia del gen 16S rRNA.

GRUPO	GÉNERO	ESPECIE
1	<i>Anaplasma</i>	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Anaplasma marginale</i> (especie tipo) - <i>Anaplasma centrale</i> - <i>Anaplasma caudatum</i> - <i>Ehrlichia phagocytophila</i> (actualmente <i>Anaplasma phagocytophilum</i>) - <i>Ehrlichia bovis</i> (actualmente <i>Anaplasma bovis</i>) - <i>Ehrlichia platys</i> (actualmente <i>Anaplasma platys</i>)
2	<i>Ehrlichia</i>	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Ehrlichia canis</i> (especie tipo) - <i>Ehrlichia chaffeensis</i> - <i>Ehrlichia ewingii</i> - <i>Ehrlichia muris</i> - <i>Cowdria ruminantium</i> (<i>Ehrlichia ruminantium</i>)
3	<i>Neorickettsia</i>	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Neorickettsia helminthoeca</i> (especie tipo) - <i>Ehrlichia risticii</i> (actualmente <i>Neorickettsia risticii</i>) - <i>Ehrlichia sennetsu</i> (actualmente <i>Neorickettsia sennetsu</i>)
4	<i>Wolbachia</i>	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Wolbachia pipientis</i>

Tomada de Dumler *et al.*, en 2001.

TABLA N° 3: Conformación de los genogrupos según publicación realizada por Dumler *et al* en el 2001.

GENOGRUPO	GÉNERO	ESPECIE
1	<i>Ehrlichia</i>	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Ehrlichia canis</i> - <i>Ehrlichia chaffeensis</i> - <i>Ehrlichia muris</i> - <i>Ehrlichia ruminantium</i> (<i>Cowdria ruminantium</i>)
2	<i>Anaplasma</i>	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Anaplasma phagocytophilum</i> * - <i>Anaplasma platys</i> - <i>Anaplasma marginale</i>
3	<i>Neorickettsia</i>	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Ehrlichia sennetsu</i> - <i>Ehrlichia risticii</i> - Agente de <i>Stellantchasmus falcatus</i> - <i>Neorickettsia helminthoeca</i>
<p>* La especie actualmente denominada <i>Anaplasma phagocytophilum</i> engloba tres especies anteriormente descritas, denominadas <i>Ehrlichia equi</i>, <i>Ehrlichia phagocytophila</i> y el agente de la ehrlichiosis granulocítica humana (EGH). Se ha observado tras los pertinentes estudios genéticos y biológicos que existen suficientes similitudes entre ellas como para clasificarlas en una única especie (Anderson y Dawson, 1991; Dumler <i>et al.</i>, 1995; Sumner <i>et al.</i>, 1997).</p>		

Tomado de Dumler *et al.*, 2001

2.4. PATOGÉNESIS DE EHRLICHIOSIS CANINA POR *Ehrlichia canis*

La patogénesis de EMC incluye un periodo de incubación de 8 a 20 días seguido de una fase aguda, subclínica y a veces crónica (Neer, 2000; Waner y Harrus, 2000).

La patogenie de la EMC aún permanece desconocida, pero la disfunción inmunológica ha sido sugerida como un mecanismo para alteraciones patológicas y signos clínicos (Bothelo *et al.*, 2004).

2.4.1. Ingreso del agente causal y fase aguda

La fase aguda se inicia después de un periodo de incubación de 8 – 20 días y dura dos a cuatro semanas, durante las cuales se multiplican los microorganismos en células mononucleares por fisión binaria y se diseminan a la totalidad del cuerpo (Neer, 2000). El parásito ingresa al torrente sanguíneo y linfático y se localiza en los macrófagos del sistema retículo – endotelial del bazo, hígado y nódulos linfáticos, donde se replica principalmente en macrófagos mononucleares y linfocitos (Ettinger, 1992; Waner y Harrus, 2000). Así, *E. canis* puede alcanzar las células del sistema mononuclear – fagocitario de estos órganos, en los que causa una hiperplasia de células plasmáticas (Neer, 2000). Desde allí, las células mononucleares infectadas, diseminan a las rickettsias hacia otros órganos del cuerpo (pulmón, riñones, meninges) (Ettinger, 1992; Waner y Harrus, 2000), en los que suele provocar lesiones inflamatorias y vasculitis, fundamentalmente de origen inmunomediado. En algunos casos, el cuadro puede desencadenar una coagulación intravascular diseminada que puede acabar con la vida del animal (Sainz *et al.*, 2000).

A los 10 -14 días post infección se presenta pirexia en todos los perros infectados, esto puede ser causado por la producción incrementada de interleucina-1 (IL-1), por células presentadoras de antígeno y células B o productos pirógenos exógenos del parásito (Gershwin *et al.*, 1995).

La trombocitopenia es un hallazgo constante en la ehrlichiosis canina (Ettinger, 1992) generalmente aparece a los 15 – 20 días post – infección y puede persistir durante todas las fases de la enfermedad (Breitschwerdt *et al.*, 1987, Harrus *et al.*, 1997). Sin embargo, se han descrito casos de ehrlichiosis sin trombocitopenia (Woody y Hoskins, 1991). La patogenia de la trombocitopenia es compleja y multifactorial, participando mecanismos inmunológicos y no

inmunológicos que producen una disminución de la producción y un aumento de la destrucción de plaquetas (Harrus *et al.*, 1996b; Grindem *et al.*, 1999).

La trombocitopenia en la fase aguda de la infección podría ser debida fundamentalmente a una destrucción plaquetaria inducida por la presencia de la producción de anticuerpos antiplaquetarios (AAP) (Harrus *et al.*, 1996b). Estos anticuerpos, se han encontrado en elevadas cantidades tanto en perros tras la infección experimental o natural, (Buhles *et al.*, 1974; Waner *et al.*, 1995; Harrus *et al.*, 1996b; Grindem *et al.*, 1999; Waner *et al.*, 2000) como en personas afectadas por ehrlichiosis (Wong y Thomas, 1998). En el perro estos anticuerpos se encuentran en unos niveles elevados a partir del séptimo día post-infección, luego comienzan a disminuir hacia el día 29 (Harrus *et al.*, 1996b; Grindem *et al.*, 1999).

La inducción para la producción de los AAP es ejercida por los antígenos ehrlichiales, que aparentemente son antigénicamente similares a las moléculas plaquetarias, esto explicaría por que el sistema inmune está involucrado en la destrucción celular (Waner *et al.*, 1995).

Se han sugerido diversos mecanismos por los que los AAP participan en la génesis de la trombocitopenia: favorecen el secuestro de plaquetas recubiertas de anticuerpos por el bazo y otros tejidos linfoides; favorecen la destrucción plaquetaria prematura por fijación del complemento o fagocitosis; inducen disfunción plaquetaria que conduce al sangrado, aún con la presencia de un número normal de plaquetas; afectan el ritmo de producción plaquetaria (Harrus *et al.*, 1996b; Grindem *et al.*, 1999).

Además, se han descrito otros mecanismos que intervienen en la patogenia de la trombocitopenia como la existencia de una citosina sérica, llamada factor de inhibición de la migración plaquetaria (PMIF) (Greene, 1997; Neer, 2000), el cual es sintetizado por los linfocitos B (Ristic y Holland, 1993) cuando son expuestos a monocitos infectados. Las concentraciones más altas de PMIF se relacionan con cepas más virulentas de *E. canis*. El PMIF impide la migración de estos elementos (Neer, 2000).

La trombocitopenia durante la fase aguda es generada por una disminución de la vida media plaquetaria, más que por un descenso en la producción de plaquetas (Reardon y Pierce, 1981). En esta fase llega incluso a observarse un incremento de la trombopoyesis (Waner *et al.*, 1995), mientras que, en la fase crónica de la enfermedad, la principal causa de trombocitopenia sería la hipoplasia de médula ósea (Woody y Hoskins, 1991).

La destrucción acelerada de eritrocitos por mecanismos inmunológicos durante la fase aguda producirá la anemia (Buhles *et al*, 1974; Reardon y Pierce, 1981). En esta fase la anemia normalmente es regenerativa (Woody y Hoskins, 1991), ya que la médula ósea suele ser hiper celular (Buhles *et al*, 1975). Un elevado número de perros con anemia regenerativa serán positivos al test de Coombs, debido al recubrimiento inespecífico de glóbulos rojos por globulinas o subsecuentes a una respuesta inmunitaria específica a antígenos de eritrocitos (Greene, 1997).

Durante esta etapa la hiperproteinemia con hipoalbuminemia, hiperglobulinemia e hipergammaglobulinemia son alteraciones bioquímicas predominantes en perros infectados por *E. canis* (Harrus *et al*, 1996a).

La exacerbada producción de anticuerpos presente en ehrlichiosis canina se traduce en la existencia de hiperproteinemia (Troy *et al*, 1980; Weiser *et al*, 1991), caracterizada por una hipergammaglobulinemia principalmente policlonal (Buhles *et al*, 1974; Ristic y Holland, 1993). No obstante, también se ha observado hipergammaglobulinemia monoclonal (Breitschwerdt *et al*, 1987). La concentración de gamma-globulinas aumenta durante la fase febril de la ehrlichiosis canina y persiste durante las fases subclínica y crónica de la enfermedad (Ristic y Holland, 1993). Los niveles de hipergammaglobulinemia y de actividad de anticuerpos específicos no guardan correlación, indicando que la mayoría de las globulinas responsables de la elevación de las gammaglobulinas no son anticuerpos frente *E. canis* (Reardon y Pierce, 1981).

La hipergammaglobulinemia monoclonal produce un aumento de la viscosidad de la sangre que puede exacerbar la tendencia hemorrágica de la enfermedad y tener consecuencias oftalmológicas como hemorragias intraoculares, desprendimiento de retina e incluso ceguera aguda (Harrus *et al*, 1998a).

La hipoalbuminemia comienza a presentarse hacia el día 14 y se recupera a partir del día 35 sin llegar a los valores normales iniciales. La hipoalbuminemia, que se observa en la primera fase de la infección, puede ser consecuencia tanto de la pérdida periférica de albúmina a fluidos edematosos por el incremento de permeabilidad vascular, pérdida de sangre o disminución de la producción de proteína debida a una enfermedad hepática concurrente (Reardon y Pierce, 1981). La hipoalbuminemia también podría mantenerse como mecanismo compensatorio de la hiperglobulinemia, para así contrarrestar un incremento de la presión oncótica y prevenir el aumento de viscosidad de la sangre (Woody y Hoskins, 1991).

La presencia de hipoalbuminemia asociada con hipergamaglobulinemia en algunos animales puede dar resultado a cuadros de ascitis (Hoskins, 1991).

La proteinuria y la hematuria, con o sin uremia, se han detectado en infecciones experimentales durante la fase aguda de ehrlichiosis. La pérdida máxima de proteínas se detecta a las 3-4 semanas post-infección y es debida a una nefropatía motivada por la existencia de lesiones ultraestructurales a nivel glomerular (Codner y Maslin, 1992).

2.4.2. Fase subclínica

Cuando la fase aguda se resuelve en forma espontánea a continuación se inicia la fase subclínica que puede durar de 40 a 120 días. Durante este periodo se normaliza el peso del perro y se resuelve la pirexia; desde el punto de vista clínico el paciente parece normal (Neer, 2000, Ettinger, 1992), el recuento de eritrocitos generalmente se normaliza (Buhles *et al.*, 1974), aunque se pueden encontrar casos con ausencia de sintomatología clínica y presencia de alteraciones hematológicas, principalmente la trombocitopenia (Codner y Farris-Smith, 1986; Waner *et al.*, 1997; Ettinger, 1992).

Las alteraciones bioquímicas como la hiperglobulinemia (hipergammaglobulinemia) e hipoalbuminemia permanecen aún durante la fase subclínica (Codner y Farris-Smith, 1986; Harrus *et al.*, 1996^a; Waner *et al.*, 1997) a diferencia de la proteinuria mencionada en la fase aguda, la cual desaparece durante esta fase (Troy *et al.*, 1980).

En diversos estudios en animales durante la fase subclínica se evidenció que los parámetros más fiables para juzgar la posible infección subclínica son la trombocitopenia leve junto a la persistencia de altos títulos de anticuerpos a *E. canis*. La presencia de hiperglobulinemia aumentaría las sospechas (Codner y Farris-Smith, 1986; Waner *et al.*, 1997).

La persistencia del antígeno en las células infectadas obra como estímulo para el sistema inmune produciendo una respuesta de tipo humoral. Los títulos de anticuerpos continúan elevándose y el animal inmunocompetente por lo regular elimina al organismo durante esta fase de la enfermedad (Neer, 2000; Sainz *et al.*, 2000), sin embargo otros animales pueden ser portadores persistentes durante meses o años. Los perros que no eliminan la infección progresan hasta la fase crónica (Neer, 2000; Sainz *et al.*, 2000; Waner y Harrus, 2000).

La identificación de ADN de *Ehrlichia* en aspirados esplénicos, obtenidos de 4 portadores persistentes después de 34 meses de la infección experimental, sugiere que el bazo es el órgano donde permanece la rickettsia en los casos subclínicos (Waner y Harrus, 2000).

2.4.3. Fase crónica

La ehrlichiosis crónica ocurre en los perros que no logran montar una respuesta inmune eficiente contra el organismo (Ettinger, 1992). No todos los perros desarrollan la fase crónica de EMC, y las condiciones que llevan al desarrollo de la misma permanecen poco claras (Waner y Harrus, 2000).

Los animales que desarrollan la fase crónica de la enfermedad pueden desarrollar una fase crónica leve que se manifiesta por pérdida de peso con alteraciones hematológicas menos graves, o una forma grave que se caracterizará por deterioro de la producción medular de elementos sanguíneos y que dará por resultado pancitopenia (Neer, 2000).

En principio no hay predisposición de raza, edad o sexo a presentar esta enfermedad, considerándose que la respuesta inmune de cada paciente juega un papel importante en la patogenia. En cualquier caso, se ha descrito que tanto el Pastor Alemán como el Springel Spaniel, pueden presentar cuadros clínicos más graves (Sainz, 2000).

En la fase crónica, la anemia será no regenerativa debido a la destrucción continua de eritrocitos, la pérdida crónica de sangre y la existencia de hipoplasia o aplasia medular (Buhles *et al.*, 1974; Woody y Hoskins, 1991).

La hipergammaglobulinemia y la hipoalbuminemia permanecen durante esta fase de la enfermedad y provienen de la estimulación antigénica persistente siendo sugestiva de una respuesta inmune inadecuada (tal vez una respuesta celular ineficiente) (Ettinger, 1992).

En fases más crónicas, la glomerulopatía y la vasculitis podrían ser las causas de la hipoalbuminemia (Woody y Hoskins, 1991; Codner y Maslin, 1992).

La aparición de proteinuria y hematuria, con o sin uremia, está relacionada con la existencia de lesiones glomerulares inmunomediadas (Breitschwerdt, 1995).

2.5. RESPUESTA INMUNE FRENTE A *Ehrlichia* spp.

El cuadro clínico y las lesiones generadas en el curso de la ehrlichiosis son consecuencia directa tanto de la propia infección bacteriana, como de la respuesta inmune desencadenada por el hospedador. La excesiva producción de anticuerpos en presencia de una respuesta celular disminuida tiene un papel fundamental en la patogenia de la enfermedad (Reardon y Pierce, 1981; Harrus *et al.*, 1999).

Para poder entender mejor la inmunopatogenia de la enfermedad, se realizará una breve descripción de cada uno de los mecanismos del sistema inmune de los animales superiores y su influencia en la resistencia frente a la infección por organismos ehrlichiales.

2.5.1. Inmunidad innata

Los mecanismos defensivos desarrollados por la inmunidad innata son: la fagocitosis, el sistema de complemento, las células natural killer (NK) y las citoquinas.

La fagocitosis: consiste en la ingestión y destrucción de sustancias extrañas, agentes patógenos o de células infectadas o degeneradas (Roitt, 1998). Las células fagocíticas de los mamíferos son de dos tipos principales: las células polimorfonucleares (PMN), las cuales son de acción rápida, pero son incapaces de mantener un esfuerzo sostenido y el segundo sistema, de los fagocitos mononucleares, está formado por células que actúan con más lentitud pero son capaces de fagocitosis repetidas (Tizard, 1998).

Para activarse el mecanismo de la fagocitosis, es necesario que el patógeno entre en contacto con la célula y se adhiera a su superficie. Para ello existen proteínas de superficie que actúan como receptores celulares para los ligandos bacterianos de *Ehrlichia* spp. (Messick y Rikihisa, 1993).

Uno de los receptores de adherencia más importante es el complemento receptor tipo III (CR3: CD11b/CD18) que promueve, entre otros mecanismos, la fagocitosis y la combustión respiratoria (Dib, 2000). Tanto el Interferon-gamma (IFN- γ), como la integrina β 2: CD11b/CD18 median la activación celular y parece ser que juegan un papel fundamental en la eliminación de la infección al limitar la replicación ehrlichial (Borjesson *et al.*, 2002).

La adhesión bacteriana produce una activación de la membrana celular y se inicia la fagocitosis con la formación de un fagosoma en el que se internaliza el agente bacteriano. Los lisosomas celulares, vacuolas celulares en cuyo interior se encuentran una gran variedad de enzimas y moléculas antimicrobianas preformadas, se fusionan al fagosoma y se produce la digestión del patógeno (Roitt, 1998).

Las bacterias intracelulares obligadas, como *Ehrlichia spp.*, necesitan para sobrevivir, ser internalizadas por células; por ello, no sólo han desarrollado mecanismos defensivos que eviten su destrucción en el interior de las células sino también, y de manera paradójica, mecanismos que estimulan el proceso de fagocitosis. Estas bacterias son capaces de replicarse en el interior de fagosomas del citoplasma de las células infectadas (Rikihisa, 1991).

Las *Ehrlichias* pierden su capacidad infectiva a las horas de hacerse extracelulares; es por ello que, al contrario que otros patógenos, estas bacterias desarrollan propiedades que les facilitan la penetración al interior de las células, favoreciendo la fagocitosis para poder replicarse en el interior de los macrófagos (Park y Rikihisa, 1991). Una vez favorecida la fagocitosis, el siguiente objetivo de la ehrlichia, para sobrevivir y multiplicarse, es evitar la fusión de los lisosomas al fagosoma de inclusión (Petrovec *et al.*, 1997). Si el hospedador es capaz de inhibir la actividad metabólica ehrlichial, se producirá la fusión de los lisosomas con la membrana de inclusión ehrlichial (Messick y Rikihisa, 1994).

La elaboración de radicales libres de oxígeno y de nitrógeno es otro de los mecanismos a través del cual los macrófagos o células fagocitarias son capaces de destruir agentes infecciosos. Los patógenos intracelulares desarrollan mecanismos para contrarrestar los efectos de estos radicales, posibilitando su supervivencia en los macrófagos. (Williams *et al.*, 1994).

Se ha demostrado experimentalmente que *N. risticii* puede penetrar en los macrófagos sin estimular una combustión respiratoria; sin embargo, en caso de exposición previa al agente sí se estimula este proceso de combustión (Williams *et al.*, 1994).

El sistema de complemento: Son escasos los estudios al respecto, si bien parece ser que el sistema del complemento no es fundamental en la resistencia frente a infecciones por *Ehrlichia spp.* Estudios realizados en ratones muestran la ineficacia del sistema de complemento en la resistencia frente a infecciones por *E. muris* (Feng y Walker, 2004).

Las células natural killer (NK): son linfocitos granulares grandes, con citoplasma abundante y gránulos citoplasmáticos, no muestran características de las células B ni T, por lo tanto son clasificados como una tercera población de linfocitos (Tizard, 1998).

Las citoquinas: El término de citoquina se aplica a un gran número de moléculas diferentes, cuya misión es transmitir señales entre células (linfocitos, fagocitos y otras células) en el curso de una respuesta inmunitaria. Son proteínas producidas por células implicadas en el proceso infeccioso que regulan todos los procesos biológicos importantes como: el crecimiento celular, la activación celular, la inflamación y la inmunidad; además de compartir la habilidad de activar y dirigir la migración de los diferentes tipos de leucocitos (Roitt, 1998).

El Factor de Necrosis Tumoral-alfa (TNF- α) combinado con el IFN- γ , producido por los linfocitos T y las células NK, son indispensables en la protección frente a infecciones ehrlichiales (Feng y Walker, 2004).

Las citoquinas pueden tener un importante papel patogénico en la infección por *Ehrlichia spp.* (Klein *et al.*, 2000). Se ha demostrado que las células infectadas por el agente de la ehrlichiosis granulocítica humana, producen citoquinas que actúan como potentes inhibidores de la proliferación de células madre de la médula ósea y pueden contribuir a las citopenias observadas en el curso de la infección (Klein *et al.*, 2000).

En un estudio realizado por Klein *et al.* en el 2000 se demostró que las células infectadas por el agente de la ehrlichiosis granulocítica humana producen citocinas que actúan como potentes exhibidores de la proliferación de células madre de la médula ósea, pudiendo contribuir a las citopenias observadas durante la infección.

2.5.2. Inmunidad adquirida

Existen dos tipos de inmunidad adquirida: la inmunidad humoral y la inmunidad celular.

2.5.2.1. Inmunidad Humoral

La respuesta humoral al parecer no juega un rol importante en la protección frente a *E. canis* y es propuesta además como contribuyente de la patogénesis de la enfermedad (Ristic y Holland *et al.*, 1993), esto se debe en parte al hecho de que las bacterias intracelulares residen dentro de las células del huésped, protegiéndose así de los anticuerpos y el complemento (Casadevall, 1998). Sin embargo, existe evidencia de que la respuesta inmune humoral puede ser

importante en la protección al inicio de la enfermedad producida por *Ehrlichia* (Kaylor *et al.*, 1991; Li *et al.*, 2001).

En un estudio realizado por Yager *et al.* (2005) para determinar si la inmunidad humoral juega un papel esencial durante la infección por *Ehrlichia* en ratones inmunocompetente, se obtuvo que los ratones carecientes de las células B fueron incapaces de resolver una dosis baja o subletal de *Ehrlichia* propone que la inmunidad humoral juega un papel importante en la defensa durante la infección por algunas bacterias intracelulares, incluyendo a la *ehrlichia*.

Una vez que la infección se ha establecido en los tejidos, los anticuerpos ejercen su acción (Kaylor *et al.*, 1991). Esta respuesta de anticuerpos, independiente de los linfocitos T, produce un control de la enfermedad en los primeros estadios de infección, antes del desarrollo de una respuesta celular completa (Winslow *et al.*, 2000). Siendo necesaria la acción de la inmunidad celular para producir la resolución completa de la infección. La respuesta humoral desencadenada en el curso de la infección por *Ehrlichia spp.* se mantiene a lo largo de toda la infección e incluso mucho tiempo después del tratamiento (Reardon y Pierce, 1981; Harrus *et al.*, 1999). Esta exagerada respuesta humoral, lejos de resolver la infección, produce graves complicaciones en el organismo (Reardon y Pierce, 1981; Harrus *et al.*, 1999).

La existencia de cantidades elevadas de anticuerpos circulantes predispone a la aparición de inmunocomplejos circulantes que pueden causar graves lesiones en el organismo tales como glomerulonefritis, poliartritis y uveítis, especialmente durante la fase crónica (Codner y Maslin, 1992; Ristic y Holland, 1993).

Esta intensa respuesta humoral desencadenada a lo largo de la enfermedad es muy amplia y no sólo se restringe a la producción de anticuerpos anti – ehrlichiales (Reardon y Pierce, 1981). También se han observado anticuerpos plaquetarios (Waner *et al.*, 1995; Harrus *et al.*, 1996b; Waner *et al.*, 2000) y antieritrocitarios (Ristic y Holland, 1993) en el curso de esta enfermedad.

2.5.2.2. Inmunidad Celular

Se ha hipotetizado que la que la inmunidad celular juega un rol importante en la patogenie de la ehrlichiosis canina (Nyindo *et al.*, 1980).

Aunque existe poco conocimiento de la inmunopatogenia de la ehrlichiosis en cuanto a la respuesta celular, se ha observado que individuos infectados por *Ehrlichia* pueden ser capaces

de superar la infección tras la fase aguda de la enfermedad, ya que una respuesta inmune adecuada, de tipo celular, llevaría a una recuperación espontánea y a la disminución o incluso a la negativización del título de anticuerpos (Artursson *et al.*, 1999). Sin embargo, sin tratamiento y si la respuesta inmune no es la adecuada, la infección se suele mantener latente estableciéndose un estado de portador prolongado (Reddy *et al.*, 1998).

Uno de los mecanismos por los que no se activa una respuesta celular efectiva puede ser la capacidad de las ehrlichias de producir variaciones antigénicas en epitopos superficiales que dificultarían su reconocimiento por los linfocitos T (Brown *et al.*, 2003).

En el curso de la infección experimental se ha observado que la respuesta inmune de tipo celular disminuye con el tiempo y desaparece sobre el día 147 post-inoculación, mientras que el título de anticuerpos humorales aumenta con el tiempo y se mantiene en una elevada concentración (Nyindo *et al.*, 1980). Por el contrario, la recuperación del animal frente a la infección se ha asociado a la existencia de linfocitosis T (Everett *et al.*, 1994, Caldwell *et al.*, 1995). La falta de respuesta inmune adecuada conduce a la cronicidad de la infección y ésta, al agotamiento del organismo, provocando la aparición de un cuadro clínico y lesional tan grave que puede conducir a la muerte del individuo. En estos casos los títulos de anticuerpos específicos anti-*Ehrlichia* se mantienen elevados a lo largo de toda la enfermedad, por lo que se intentó establecer, sin éxito, una medida de la respuesta celular en base a su correlación con el título de anticuerpos (Nyindo *et al.*, 1980).

En el estudio realizado por Botelho de Castro realizado en 8 pastores alemanes sanos, de los cuales cuatro fueron inoculados endovenosamente con sangre de perros con *E. canis*, demostraron que en animales infectados, las células CD8⁺ estuvieron incrementadas en las regiones folicular y medular de los nódulos linfáticos de los animales infectados con *E. canis*. Lo cual señala que las respuestas mediadas por células fueron pronunciadas en perros inoculados (Botelho *et al.*, 2004).

2.5.3. Inmunopatogenia

La infección por *Ehrlichia spp.* se produce tras la picadura del hospedador por una garrapata hematófaga. La propia picadura provoca inflamación y liberación de mediadores químicos que a su vez, producen quimiotaxis de células inflamatorias. Este efecto inflamatorio favorece la infección por *Ehrlichia spp.*, ya que cuanto mayor sea el número de granulocitos o

monocitos/macrófagos en el punto de inoculación, mayor probabilidad de infectar estas células (Theis y Budwiser, 1997; Rikihisa, 1991).

Tras un periodo de incubación que, puede variar de ocho a veinte días (Neer, 2000), se produce la diseminación de los agentes ehrlichiales por la circulación sanguínea y linfática (Buhles *et al.*, 1974). El potencial patogénico del organismo se ve favorecido por la movilidad de los macrófagos que pueden diseminar la infección por todo el organismo.

La infección por *Ehrlichia spp.* produce una hiperplasia del sistema linforreticular que se manifiesta a nivel de los órganos linfoides, por una activación de los centros germinales con incremento de la población blástica. Esta transformación se observa tanto a nivel del bazo como de los nódulos linfáticos, produciéndose una disminución de población linfocitaria madura y un aumento de la población linfoblástica. Esta actividad hiperplásica afecta tanto a los linfocitos T como a los B durante la fase aguda de la infección (Reardon y Pierce, 1981).

La hiperplasia linforreticular conduce a una esplenomegalia que favorece el secuestro de plaquetas y eritrocitos, lo que contribuye a la presentación de anemia y a la trombocitopenia observada. Además, el bazo como gran productor de anticuerpos contribuye a la patogenia y gravedad de la enfermedad a través de la inefectiva sobreproducción de anticuerpos y como fuente de macrófagos (Harrus *et al.*, 1997; Harrus *et al.*, 1999).

En los primeros estadios de las infecciones ehrlichiales se observa un incremento en la actividad de la médula ósea (Buhles *et al.*, 1975; Reardon y Pierce, 1981) aunque esto no repercute en un incremento en la producción de células sanguíneas maduras (Reardon y Pierce, 1981).

El sistema linforreticular en su conjunto tiene un papel multifactorial en la infección aguda por *E. canis* y las lesiones histológicas que afectan a las células del sistema hemático y linforreticular reflejan una reacción exagerada del hospedador en un intento de compensar una respuesta inmune ineficaz (Reardon y Pierce, 1981; Bothelo *et al.*, 2004). En este sentido, se ha observado un incremento del número de linfocitos tanto en nódulos linfáticos como en bazo en esta fase aguda. Concretamente, en nódulos linfáticos esta población está integrada por un gran número de linfocitos CD8+ que pueden inducir un daño tisular por la eliminación a través de citolisis de las células infectadas, contribuyendo así a la patogenia de la enfermedad (Bothelo *et al.*, 2004).

Tras la fase aguda de la ehrlichiosis, los animales pasan a un estado subclínico que puede establecerse durante años y en el que, en ausencia de sintomatología clínica, el agente permanece en órganos como bazo y médula ósea. La fase subclínica de la enfermedad aparece a las 6-9 semanas de la infección y puede durar de 1 mes a 5 años (Buhles *et al.*, 1974). Esta fase se caracteriza por ausencia de sintomatología con o sin presencia de alteraciones hematológicas y por títulos elevados de anticuerpos humorales (Codner y Farris – Smith, 1986). Durante esta fase el animal puede recuperarse espontáneamente, ser tratado y así eliminar la infección o que animal pase a la fase crónica de la enfermedad (Ettinger, 1992).

Las condiciones por las que se desarrolla la fase crónica de la infección son desconocidas y pueden estar relacionadas con la raza, el estado inmunitario del individuo, condiciones de estrés, coinfección con otros parásitos o reinfecciones persistentes (Harrus *et al.*, 1997). Factores individuales del paciente asociados con la resistencia o susceptibilidad a la enfermedad clínica, probablemente relacionados con su sistema inmune, deben ser determinados todavía (Wong y Thomas, 1998).

En cuanto a la patogenia de la fase crónica de la enfermedad, poco se sabe (Harrus *et al.*, 1999). La existencia de una disregulación previa del sistema inmune, bien por autoinmunidad o por infección con otros agentes, predispone a los pacientes al desarrollo de enfermedad clínica en el curso de la infección por *Ehrlichia spp.* (Wong y Thomas, 1998).

Parece ser que situaciones de estrés o de inmunosupresión son capaces de desencadenar un cuadro clínico tras una prolongada fase subclínica (Codner y Farris-Smith, 1986). Sin embargo, en el curso de infecciones experimentales y durante la fase aguda de la enfermedad, un estado de inmunosupresión ni previene ni modifica significativamente las manifestaciones clínicas de la ehrlichiosis (Reardon y Pierce, 1981).

La participación de mecanismos inmunomediados en la patogenia de la enfermedad es, si cabe, más acusado en la fase crónica de la misma (Harrus *et al.*, 1999). La gravedad de la fase crónica se ha asociado a la trombocitopenia y al grado de aplasia medular (Buhles *et al.*, 1974; Codner y Farris-Smith, 1986). La hipoplasia de médula ósea observada en fases crónicas puede ser el resultado de la infección persistente que promueve el fallo o supresión de las células madre pluripotenciales y puede estar inmunológicamente mediada (Huxsoll, 1990), habiéndose observado infiltrados plasmocitarios en la médula ósea (Frank y Breitschwerdt, 1999).

También se propone la existencia de un factor esplénico supresor de la hematopoyesis cuya producción se encuentra inducida por la infección por *Ehrlichia sp.* Es posible que este factor juegue un papel en la supresión de la médula ósea que aparece en la fase crónica de la enfermedad (Harrus *et al.*, 1997).

Durante esta fase crónica se observa también infiltración extensiva de los órganos parenquimatosos por células plasmáticas y acúmulos perivasculares de estas células en pulmones, riñones, bazo, meninges y ojos, principalmente (Reardon y Pierce, 1981). Se ha asociado a la enfermedad el desarrollo de glomerulonefritis y nefropatía con pérdida de proteínas en la fase crónica de la enfermedad por depósitos de inmunocomplejos circulantes (Frank y Breitschwerdt, 1999).

La infiltración por células plasmáticas de las meninges está relacionada con la aparición de signos neurológicos asociados a la ehrlichiosis crónica (Woody y Hoskins, 1991, Frank y Breitschwerdt, 1999).

2.6. DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de la enfermedad se basa en la anamnesis, presentación clínica, hallazgos patológicos al examen clínico y se confirma con las pruebas de laboratorio (Waner y Harrus, 2000).

2.6.1. Diagnóstico clínico

El cuadro clínico de la ehrlichiosis canina es totalmente inespecífico, su sintomatología puede aparecer en numerosas enfermedades y no siempre aparecen conjuntamente en el curso de la EMC (Ettinger, 2000).

La detección de garrapatas en la exploración o el conocimiento de una infestación previa en un animal enfermo, o incluso sano, es suficiente para sugerir una probable infección por *Ehrlichia spp.*, en especial, en áreas con una alta tasa de prevalencia (Woody y Hoskins, 1991; Keefe *et al.*, 1982).

2.6.1.1. Signos clínicos en fase aguda

Durante esta fase es posible observar signos clínicos leves e inespecíficos como fiebre, exudado oculonasal, anorexia, depresión, pérdida de peso, esplenomegalia y linfadenomegalia,

además, los perros pueden presentar tendencia al sangrado, petequias y equimosis en la piel y membranas mucosas, y ocasionalmente epistaxis (Neer, 2000; Waner y Harrus, 2000).

Los signos oculares no son infrecuentes e incluyen uveítis anterior, opacidad corneal (edema y/o depósito de precipitados celulares), hipema, tortuosidad de vasos retinales y lesiones corio-retinales focales. Puede haber desprendimiento de retina y ceguera debido a hemorragias subretinales. Se pueden presentar otros signos clínicos como vómitos, claudicación, ataxia y disnea (Waner y Harrus, 2000).

También puede aparecer edema de extremidades o de escroto (Woody y Hoskins, 1991; Breitschwerdt, 1995).

Diferentes estudios han descrito variación en los signos clínicos y esto puede ser debido a muchos factores, incluyendo diferencias en la patogenicidad entre las cepas de ehrlichia, raza de perros, infecciones concomitantes con otras enfermedades transmitidas por garrapatas y el estado inmunitario del perro (Waner y Harrus, 2000).

2.6.1.2. Signos clínicos en fase subclínica

La fase subclínica de la enfermedad ocurre usualmente de 6 a 9 semanas después de la infección inicial, durante esta etapa no se observa sintomatología, pero persisten los cambios hematológicos mencionados anteriormente (Ettinger, 1992).

2.6.1.3. Signos clínicos en fase crónica

La fase crónica ocurre en los perros que no lograron montar una respuesta inmune eficiente contra el organismo (Ettinger, 1992).

Los signos clínicos de la fase crónica reflejan las modificaciones fisiopatológicas resultantes del proceso anémico y de la infiltración perivascular de muchos órganos con células linforreticulares y plasmocitos (Ettinger, 1992).

Los signos más comunes durante esta fase son debilidad, depresión anorexia, pérdida crónica de peso, palidez de las mucosas, fiebre y edema periférico, especialmente en miembros posteriores y escroto, sangrado por trombocitopatía, como petequias y equimosis dérmicas y en membranas mucosas y epistaxis son hallazgos frecuentes (Waner y Harrus, 2000).

Se observan infecciones bacterianas secundarias y por protozoarios, neumonía intersticial, falla renal y artritis pueden presentarse durante la enfermedad crónica severa (Waner y Harrus, 2000).

Las manifestaciones respiratorias, oculares y cutáneas suelen ser más habituales en la fase crónica, aunque también se han descrito en la fase aguda (Gelatt, 1991).

El cuadro respiratorio se caracteriza por la presentación de exudado mucopurulento acompañado en ocasiones de disnea y tos. Pudiendo ser la disnea debida a la existencia de anemia severa (Sainz, 1996).

Los signos oftalmológicos suelen ser más frecuentes en la fase crónica de la enfermedad, habiéndose descrito uveítis anterior, fotofobia, conjuntivitis, opacidad corneal e hipema. Más raramente se puede presentar retinitis difusa, desprendimiento de retina, hemorragia sub-retiniana y neuritis óptica (Troy *et al.*, 1980). Estos cuadros oftalmológicos graves parecen estar asociados a la hiperviscosidad sanguínea secundaria a la gammapatía monoclonal presente en algunos casos de ehrlichiosis (Harrus *et al.*, 1998a).

Los signos neurológicos pueden ocurrir tanto en la enfermedad aguda como crónica. Estos incluyen signos de meningoencefalitis, como: lomo arqueado, dolor severo de cuello y lomo, paraparesia o tetraparesia, ataxia, déficit de nervios craneales y convulsiones. Los signos neurológicos pueden ser debidos a hemorragias, infiltración celular extensa y compresión perivascular de las meninges (Waner y Harrus, 2000).

2.6.2. Diagnóstico laboratorial

2.6.2.1. Examen hematológico

La trombocitopenia y la anemia arregenerativa son los hallazgos hematológicos más constantes en los casos agudos y crónicos (Ettinger, 1992).

La trombocitopenia puede aparecer a los 15 – 20 días postinfección y puede perdurar durante todas las fases de la enfermedad (Codner y Farris-Smith, 1986).

El diagnóstico de laboratorio mediante la detección de la *E. canis* en los frotis de leucocitos periféricos no es eficiente en la práctica clínica a causa de la presencia variable del organismo en la sangre periférica (Ettinger, 1992)

2.6.2.2. Bioquímica sanguínea

Hiperproteinemia con hipoalbuminemia, hiperglobulinemia e hipergammaglobulinemia son las alteraciones bioquímicas predominantes en perros infectados por *E. canis* (Harrus *et al.*, 1996a).

La hiperproteinemia es debida a una hiperglobulinemia producida por un estímulo antigénico crónico (Troy *et al.*, 1980; Codner y Farris-Smith, 1986; Weiser *et al.*, 1991). El aumento de globulinas no está relacionado con la cantidad de anticuerpos producidos frente a *E. canis*, como con la duración de la enfermedad y la producción de autoanticuerpos (Reardon y Pierce, 1981). Mediante electroforesis sérica se suele observar hiperglobulinemia policlonal, aunque existen casos en donde se presentan gammapatías monoclonales (Neer, 2000).

La hipoalbuminemia tiene diversas causas, durante la primera fase de la enfermedad puede deberse al agotamiento de la albúmina en el proceso inflamatorio y el catabolismo proteico asociado a la enfermedad (Woody y Hoskins, 1991) y a la pérdida periférica de albúmina a fluidos edematosos por el incremento de la permeabilidad vascular o pérdida de sangre. La hipoalbuminemia también podría deberse como mecanismo compensatorio de la hiperglobulinemia, para así contrarrestar un incremento de la presión oncótica y prevenir el aumento de la viscosidad de la sangre (Woody y Hoskins, 1991). Durante la fase crónica la causa de la hipoalbuminemia podrían ser la glomerulopatía y la vasculitis (Woody y Hoskins, 1991; Codner y Maslin, 1992). Se ha observado una relación inversamente proporcional entre la cantidad de proteína pérdida en orina y la concentración sérica de albúmina (Codner y Maslin, 1992).

2.6.2.3. Análisis de orina

Las alteraciones en la orina mayormente detectadas en infecciones experimentales durante la fase aguda de la enfermedad son la proteinuria y la hematuria (Codner y Maslin, 1992).

Experimentalmente se observa una pérdida máxima de proteínas urinarias, que consiste en especial de albúmina, dos y media a tres y media semanas después de la inoculación y se resuelve alrededor de las seis semanas después de la infección (Neer, 2000). La proteinuria y hematuria desaparecen durante la fase subclínica y vuelve a aparecer durante la fase crónica, esta vez relacionada con la existencia de lesiones glomerulares inmunomediadas (Troy *et al.*, 1980)

2.6.3. Diagnóstico serológico

Los títulos elevados de anticuerpos se pueden observar tras la exposición al agente, durante la fase aguda, subclínica y crónica de la infección e incluso después de un tratamiento efectivo. (Neer, 2000; Cohn, 2003).

En fases iniciales de la infección aguda y en animales moribundos se pueden encontrar títulos negativos, en los primeros por no haber dado tiempo a la producción de una respuesta humoral y en los segundos por agotamiento de la producción de anticuerpos (Cohn, 2003).

En el suero se detectan anticuerpos antiehrlichia del tipo inmunoglobulina G desde los 7 post-infección (Neer, 2000), durante los siete primeros días posteriores a la inoculación (PI), los títulos de anticuerpos consisten en Ig A e Ig M y alrededor del día 20 la mayor parte de anticuerpos corresponde a Ig G y en animales no tratados las concentraciones de anticuerpos llegan a alcanzar valores máximos a los 80 días de la infección (Neer, 2000).

Son dos las técnicas serológicas más empleadas para el diagnóstico de ehrlichiosis canina: la inmunofluorescencia indirecta y las técnicas de enzimoimmunoensayo.

La inmunofluorescencia indirecta (IFI) es la técnica más empleada tanto en medicina veterinaria como en medicina humana y presenta una alta sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de *E. canis* (Ristic y Holland, 1993; Waner *et al.*, 2000). En la actualidad, la IFI se sigue considerando la técnica diagnóstica de referencia (Neer, 2000). Esta técnica aporta resultados específicos con el uso de cultivos celulares infectados (Dawson *et al.*, 1991; Ettinger, 1992). En relación con su especificidad, se ha comprobado la ausencia de reacciones cruzadas con un gran número de agentes: *Leptospira canicola*, *Brucella canis*, herpesvirus canino, virus de la parainfluenza, *Borrelia burgdorferi* y diversas *Rickettsias* como *R. tsutsugamushi*, *R. canada*, *R. burnetti*, *R. mooseri*, *R. akari* (Magnarelli y Anderson, 1993), pero se ha señalado la existencia de reacciones cruzadas entre diferentes especies de la familia *Ehrlichia* *aceae*, siendo éstas más intensas entre las especies del mismo género, aunque los títulos son siempre más elevados para el agente que está causando la infección (Woody y Hoskins, 1991). Existe una fuerte reacción cruzada entre *E. canis* y *E. chaffeensis* (Anderson y Dawson, 1991).

Recientemente se han comercializado pruebas serológicas de muestreo que emplean la tecnología ELISA, para su empleo rápido en la propia clínica veterinaria, con un valor cualitativo y no cuantitativo. Se ha observado una buena correlación entre los resultados de

estas técnicas de ELISA y la inmunofluorescencia indirecta con una sensibilidad igual o superior al 71% y una especificidad que puede llegar al 100%. La sensibilidad de estas pruebas disminuye para valores del título de anticuerpos menores de 1:320 (Waner *et al.*, 2000), por lo que en caso de sintomatología compatible y resultado negativo, sería aconsejable repetir la prueba en una o dos semanas, para dar tiempo a un aumento significativo del título de anticuerpos en el caso de infecciones agudas.

Estas pruebas rápidas pretenden, ante todo, tener un valor orientativo, siendo la especificidad y sensibilidad superior en el caso de la IFI (Waner *et al.*, 2000).

2.6.4. Diagnóstico molecular

La reacción en cadena de la polimerasa (polymerase chain reaction o PCR) es una técnica molecular basada en las propiedades bioquímicas del ADN, asociadas a la composición y secuencia de nucleótidos. La PCR emplea segmentos cortos y simples de nucleótidos, llamados cebadores, cuyas secuencias son complementarias de las secuencias del ADN del organismo que se investiga. La amplificación de los cebadores permite la identificación del ADN bacteriano. Los cebadores y otros reactivos necesarios para que se produzca la reacción en cadena de la polimerasa se añaden a un volumen de solución que contiene ADN representativo de la muestra de estudio, incluido ADN del hospedador y del microorganismo que se busca. La muestra puede ser cualquier tejido del hospedador que pueda portar al agente investigado (Sellon, 2003).

Los cebadores empleados para la detección de agentes ehrlichiales pueden ser genéricos o especie-específicos. Los laboratorios de diagnóstico suelen emplear cebadores genéricos y, cuando el resultado es positivo, emplean cebadores especie-específicos (Cohn, 2003). Existen variaciones de la técnica según los cebadores empleados, la concentración de los reactivos, la temperatura y/o la duración de cada ciclo. El protocolo a utilizar no está consensuado a nivel general para todos los laboratorios, debiéndose en cualquier caso optimizar y homogeneizar las condiciones de la técnica en cada laboratorio (Cohn *et al.*, 2003)

Si bien en principio, el diagnóstico molecular parece ser el más específico y fiable en cuanto a la detección de organismos, tiene también sus limitaciones. Así la extremada sensibilidad de estas pruebas, puede conducir con facilidad a resultados falsos positivos por contaminación. Por otro lado, tras la muerte del microorganismo investigado, sus ácidos nucleicos pueden permanecer en el hospedador, sin que el periodo de permanencia de los mismos se conozca en la actualidad (Sellon, 2003).

Aunque es menos probable, se pueden observar falsos negativos debido a la presencia en la muestra de inhibidores de la PCR, como la heparina. También la elección de la muestra puede condicionar los resultados. Las ehrlichias y fundamentalmente *Ehrlichia canis* podrían permanecer secuestradas en células de tejidos del sistema mononuclear fagocitario (bazo, médula ósea); generalmente las muestras empleadas en el diagnóstico rutinario proceden de sangre del paciente, por lo que se podría obtener resultados negativos en sangre y existir *Ehrlichia canis* secuestrada en otros tejidos (Harrus *et al.*, 1998b)

Al comparar la PCR con otras técnicas diagnósticas, se observa que su sensibilidad para la detección de *E. canis* tanto en sangre como en otros tejidos, parece ser similar o ligeramente inferior a la de otras técnicas de uso habitual como la IFI o el ELISA (Iqbal *et al.*, 1994), por lo que las pruebas de diagnóstico molecular no deben suplir a las pruebas serológicas en el diagnóstico de la ehrlichiosis y deben considerarse pruebas complementarias a las tradicionalmente empleadas (Sellon, 2003).

2.7. EHRlichiosis EN EL PERÚ

La ehrlichiosis ha sido reportada en diversas especies de animales y en hombre (Yu *et al.*, 2006), actualmente esta enfermedad tiene una amplia distribución en el mundo pero es más frecuente en regiones tropical y subtropicales (Ettinger, 1992).

En el Perú se han reportado únicamente dos agentes infecciosos pertenecientes a la Familia *Anaplasmataceae*, *Ehrlichia canis* y *Anaplasma marginale*, los cuales son los causantes de la ehrlichiosis monocítica canina (EMC) y de Anaplasmosis Bovina, respectivamente (Chavera *et al.*, 1982).

En el 2002 se encontró una seroprevalencia de 16.5 % para ehrlichiosis canina en Lima Metropolitana, este estudio se realizó en las áreas de los Pantanos de Villa en Chorrillos, en Rinconada del Lago en La Molina y en las lagunas de oxidación del distrito de San Juan de Miraflores, los meses de febrero a mayo del 2001 (Adrianzén, 2003) y en 2006 en Sullana - Piura se encontró una seroprevalencia de hasta 76% (San Miguel, 2006).

En el 2005 se reportó en el distrito de la Molina un canino con ehrlichiosis granulocítica canina (EGC) esto motivó a sospechar sobre la presencia de otras especies de Ehrlichia como, *Ehrlichia chaffeensis* y/o *Ehrlichia ewingii*, los cuales son patógenos en humanos (Li *et al.*, 2005).

Recientemente en el 2007 se identificó molecular y serológicamente a *Ehrlichia canis* en el Perú (Vinasco *et al.*, 2007).

La presencia de perros con *E. canis* en el Perú suscita la inquietud que los perros puedan actuar como un reservorio de agentes de ehrlichiosis humana en esta región como sucede en Venezuela (Unver *et al.*, 2001). La posibilidad que los perros puedan facilitar la transmisión de esta bacteria a humanos incrementaría su importancia zoonótica (Vinasco *et al.*, 2007).

La ehrlichiosis Monocítica Humana (EMH) causada por *Ehrlichia chaffeensis* (otra especie del género *Ehrlichia*) no ha sido reportada en nuestro país, sin embargo una encuesta serológica de ehrlichiosis humana causada por *Ehrlichia chaffeensis* mediante el uso de ensayos de inmunofluorescencia indirecta (IFA) encontró una seroprevalencia general de *Ehrlichia chaffeensis* de 13% (21 de 160) y la seroprevalencia en mujeres y hombres fue de 15% (16 de 106) y el 9% (5 de 53), respectivamente (Moro *et al.*, 2009).

En 2009, se desarrolló y estandarizó una prueba de inmunofluorescencia indirecta para detección de Ig G e Ig total para el diagnóstico de ehrlichiosis humana, esta prueba utilizó como antígeno a células DH82 infectadas con *Ehrlichia chaffeensis* cepa *Sapulpa*. Se evaluó 130 sueros de pacientes febriles negativos para Rickettsiosis y enfermedad de Carrión procedentes de Ancash, que habían ingresado al Instituto Nacional de Salud entre los años 2004 a 2006 y encontró que 12 (9,2%) sueros fueron positivos a ehrlichiosis (Anaya *et al.*, 2009).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES

3.1.1. Lugar y época de ejecución del estudio

El presente estudio se realizó en Lima Metropolitana y la procedencia de los individuos participantes fue de diferentes distritos de la ciudad. La toma de muestras y el procesamiento de las mismas fue realizada durante el periodo de Mayo 2009 a Octubre 2009 en el Laboratorio de Patología Clínica, así como en la Unidad de Virología del Laboratorio de Microbiología de la FMV – UNMSM, ubicados en el distrito de San Borja.

3.1.2. Tamaño y recolección de muestras

Se colectaron muestras de sangre periférica a individuos que realizaban actividades veterinarias y hayan estado en contacto con animales que habían sufrido ehrlichiosis canina en Lima Metropolitana. El tamaño de la muestra se calculó en base a la prevalencia hallada por Anaya en Ancash – Perú (Anaya *et al.*, 2009), utilizando la fórmula para estimar una proporción en poblaciones infinitas (Wayne, 1996), con nivel de confianza del 95% y un error máximo permisible de 6 %. Se determinó un mínimo de 90 animales.

$$n = \frac{Z^2 \cdot p \cdot q}{d^2}$$

n = tamaño de muestra

Z = valor tabular (95% de confianza): 1.96.

p = proporción referencial: 0.092 (Anaya *et al.*, 2009)

$$q = 1 - p$$

d = Error máximo admitido (6 %)

3.1.2.1. Criterios de inclusión:

- Individuos que realizaban actividades veterinarias (Médicos Veterinarios, practicantes de Medicina Veterinaria, bañadores y personal de limpieza en consultorios veterinarios)
- Individuos en contacto con animales que hayan sufrido ehrlichiosis canina.

3.1.2.2. Criterios de exclusión:

- Individuos que no realizaban actividades veterinarias o cercanas a la carrera profesional.
- Individuos que no habían estado en contacto con animales que hubieran sufrido ehrlichiosis canina, así estuviesen realizando actividades veterinarias.

3.1.3. Equipos y materiales

- Microscopio de fluorescencia con sistema de filtro para FITC (longitud de onda de máxima excitación 490 nm, longitud de onda de emisión media 530 nm) y aumento de 400x y 1000x.
- Incubadora o baño maría de 37 °C.
- Cámara húmeda para los pasos de incubación de las placas.
- Placas de microtitulación para diluciones séricas.
- Micropipeta(s) de precisión (Tips).
- Cubreobjetos de vidrio de 24 x 50 mm.
- Tubos de ensayo (10ml).
- Agujas I.V o sistemas de extracción por vacío.
- Contenedor pequeño de agujas.
- Etiquetas de identificación.
- Guantes de látex (talla S y M).
- Algodón y alcohol.
- Cuaderno de registro.
- Agua desionizada o destilada.
- Botella de agua limpia 250 o 500 mL para PBS.

3.1.4. Reactivos

- Placas de 12 pocillos, conteniendo monocitos caninos DH82 infectados con *Ehrlichia chaffeensis* y *Ehrlichia canis*. *Fuller Laboratories*.
- Conjugado (2.5 mL). El conjugado para los controles es Anti IgG canino y el conjugado para las muestras problema (sueros humanos), corresponderá a Anti IgG humano. *Fuller Laboratories*.
- Control Positivo (0.5 mL), contiene suero canino contra *Ehrlichia canis* a una dilución de 1:50. *Fuller Laboratories*.
- Control Negativo (0.5 mL), contiene suero canino no reactivo contra *Ehrlichia canis* a dilución de 1:50. *Fuller Laboratories*.
- Medio de montaje 1 mL, contiene glicerol (50% v/v) en PBS.
- PBS. 1 litro

3.2. METODOLOGÍA

3.2.1. Toma de muestra

La toma de muestra fue realizada por el Médico Cirujano Jorge Kohatzu, quien labora en la Clínica Privada “Medalla Milagrosa” Lima – Perú, así como por la Mg. Químico Farmacéutico Olga Li Elías, Jefe del Laboratorio de Patología Clínica de la Facultad de Medicina Veterinaria - Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Procedimiento:

- Se colocó al paciente en postura cómoda y con la zona de punción apoyada y bien visible.
- Se colocó una ligadura a unos 10 ó 15 cm. por encima del sitio de punción.
- Se desinfectó la zona con gasa impregnada en antiséptico.
- Se extrajo 5 ml. de sangre en tubos de 10 ml. sin anticoagulante, con agujas hipodérmicas estériles de 21 X 1,5 pulgadas.
- Se retiró el compresor y se realizó presión sobre el punto de punción.
- Se identificó correctamente los tubos con las muestras.

3.2.2. Procesamiento de las muestras

- La muestra de sangre se dejó en reposo hasta la formación del coágulo.
- Seguidamente, se centrifugó la muestra de sangre a 3500 – 4000 rpm por 10 minutos para la obtención del suero.
- Se transfirió suero asépticamente a viales nuevos (5ml).
- Los viales fueron almacenados a 2 – 8 °C. Cuando la evaluación fue retardada por más de 5 días, las muestras se congelaron a -20 °C.
-

3.2.3. Prueba serológica (*E. canis*. y *E. chaffeensis*): Inmunofluorescencia indirecta

- Las muestras refrigeradas se utilizaron directamente (previa homogenización) y las muestras conservadas en congelación se dejaron a temperatura ambiente por 30 minutos, para luego ser homogenizadas.
- Se prepararon diluciones a 1:50 en PBS para todos los sueros a evaluar.
- Se utilizaron placas para inmunofluorescencia indirecta, con 12 pocillos c/u. Dichas placas contienen células DH82 (monocitos caninos) infectados con *Ehrlichia canis* y *Ehrlichia chaffeensis*.
- Los sueros controles positivo y negativo se utilizaron sin diluir, debido a que la presentación comercial (*Fuller Laboratories*) corresponde a una dilución 1:50, utilizando los dos primeros pocillos para dichos controles.
- Cada dilución de suero (1:50) a ser evaluada, se colocó en un pocillo de cada placa (*E. canis* y *E. chaffeensis*). El volumen que se colocó sobre cada pocillo fue de 15 ul. Es decir, cada placa fue usada para el testeado de 10 sueros con dilución.
- Se colocaron ambas placas en una cámara húmeda e incubar a 37 °C \pm 0.5 por 35 minutos.
- Se retiraron las placas de incubar y se lavaron con PBS. Sacudimos el PBS de las placas y repetimos este lavado 3 veces, evitando que los pocillos se sequen.
- Seguidamente, a cada pocillo, se añadió 15 ul. del conjugado (el conjugado de los controles será de origen canino y el conjugado de las muestras problema fue de origen humano).
- Se colocaron las placas nuevamente a la cámara húmeda de incubación a 37 °C \pm 0.5 °C por 35 minutos. La incubación debe ser en oscuridad, para proteger el conjugado fotosensible.
- Se retiraron las placas de la incubación y se lavaron con PBS (mínimo 3 veces).

- Añadimos 12 ul. de medio de montaje (marca VMRD) a cada pocillo y colocamos un cubreobjetos.
- Para leer las placas utilizamos un microscopio de fluorescencia a un aumento de 400X, comparando cada pocillo con la intensidad visual y apariencia de las inclusiones de *Ehrlichia* vistas en los pocillos control positivo y negativo. Las placas fueron almacenadas a 2 – 8 °C en la oscuridad hasta por 24 horas.

3.2.4. Interpretación de resultados

Una reacción positiva aparece como cuerpos de inclusión teñidos de color verde fluorescente y de forma regular vistos en el citoplasma de las células infectadas (monocitos DH82). El tamaño, apariencia y densidad de las inclusiones (mórulas) deben ser comparadas con la reacción del control positivo. Patrones de reactividad diferentes de aquellos que son vistos en el Control Positivo deben ser considerados “no específicos o negativos”.

3.3. ANÁLISIS DE DATOS

3.3.1. Análisis estadístico

La frecuencia de individuos reactivos se presentan mediante proporciones, mostrando sus correspondientes Intervalos de Confianza (IC) al 95 % mediante la fórmula:

$$\left(p_n - z_{\alpha/2} \sqrt{\frac{p_n(1 - p_n)}{n}}, p_n + z_{\alpha/2} \sqrt{\frac{p_n(1 - p_n)}{n}} \right)$$

P_n = frecuencia de individuos positivos

n = tamaño de la muestra

$Z_{\alpha/2}$ = 1.96 para el 95% de confianza

Se calculó la prevalencia (proporción de pacientes infectados de acuerdo al número de muestras positivas) y con la finalidad de apreciar la posible asociación entre el resultado serológico y el sexo, se aplicó la prueba de Chi – cuadrado, con un $\alpha = 0.05$.

$$X^2 = \sum_{i=1}^k \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i}$$

V. RESULTADOS

Cuadro N° 1: Número y porcentaje de individuos seropositivos a *E. canis* y *E. chaffeensis*, Lima, 2009.

Agente Ehrlichial	N° de muestras	Seropositivos (+)	Porcentaje Seropositivos	Intervalo de Confianza (IC)
<i>Ehrlichia canis</i>	90	21	23.33 %	$0.146 \leq p \leq 0.320$
<i>Ehrlichia chaffeensis</i>	90	18	20.00 %	$0.117 \leq p \leq 0.283$

Cuadro N° 2: Número y porcentaje de individuos varones y mujeres seropositivos a *E. canis*, Lima, 2009.

	N° de muestras	(+) <i>Ehrlichia canis</i>	Porcentaje Seropositivos (%)	X ²
Varones	55	12	21.8 %	0.18
Mujeres	35	9	25.7 %	
TOTAL	90	21	23.33 %	

Cuadro N° 3: Número y porcentaje de individuos varones y mujeres seropositivos a *E. chaffeensis*, Lima, 2009.

	N° de muestras	(+) <i>Ehrlichia chaffeensis</i>	Porcentaje (%)	X ²
Varones	55	10	18.2	0.29
Mujeres	35	8	22.86	
TOTAL	90	18	20.00	

Foto N° 1: Suero positivo a *Ehrlichia canis* por inmunofluorescencia indirecta (IFA)
Dilución (1:50) – Objetivo 100x

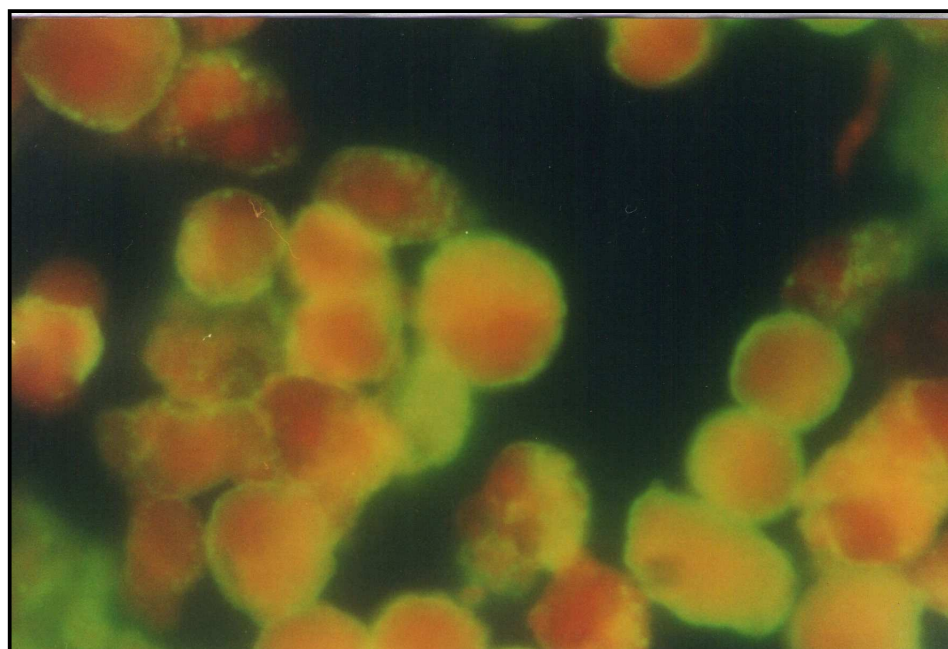


Foto N° 2: Suero negativo a *Ehrlichia canis* por inmunofluorescencia indirecta (IFI).
Dilución (1:50) – objetivo 100X.

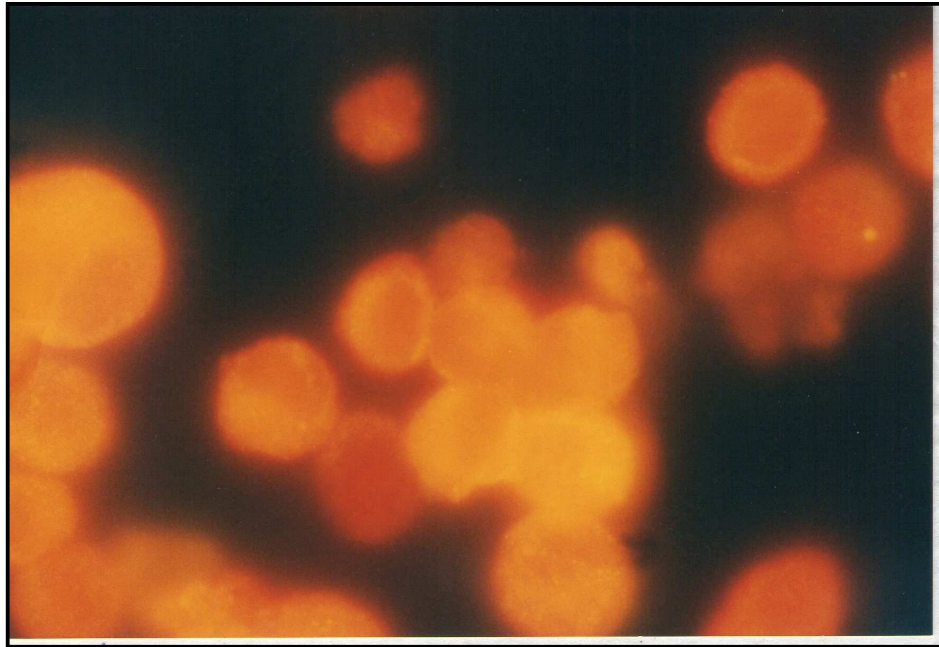


Foto N° 3: Suero positivo a *Ehrlichia chaffeensis* por inmunofluorescencia indirecta
Dilución (1:50) – objetivo 100X.

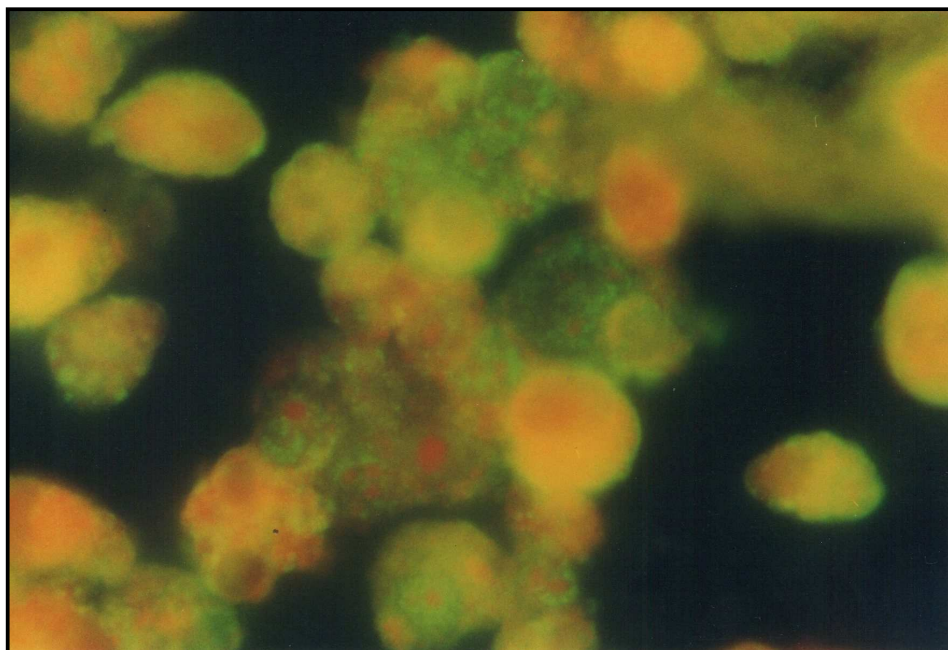
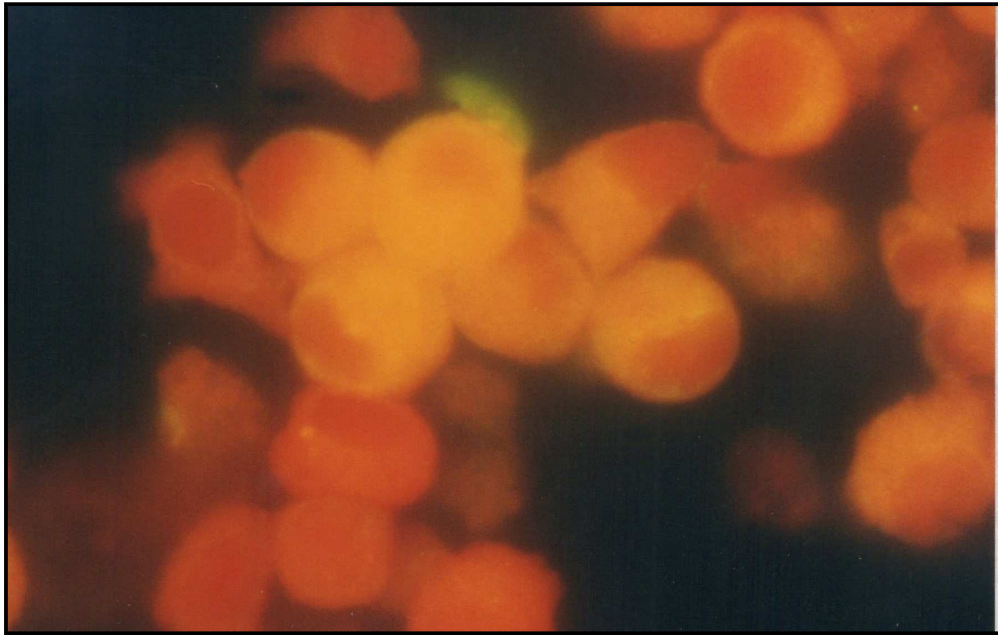


Foto N° 4: Suero negativo a *Ehrlichia chaffeensis* por inmunofluorescencia indirecta
Dilución (1:50) – objetivo 100X.



V. DISCUSIÓN

En Venezuela, desde 1994 se han reportado los primeros casos de ehrlichiosis humana (*E. chaffeensis*, *EGH*, y *E. platys*) (Chen *et al.*, 1994; Tamí *et al.*, 1994; Arraga, *et al.*, 1996; Pérez *et al.*, 1996), además de poder detectar en plaquetas de humanos mórulas semejantes a las encontradas en caninos (Tamí *et al.*, 1994; Tamí, 2002). En 1996, también en Venezuela, fue aislado un agente ehrlichial semejante a *E. canis* en un hombre asintomático (Pérez *et al.*, 1996). Más adelante en el 2006, mediante PCR, utilizando el gen ARNr 16S, un estudio detectó un 30 % de seropositivos en pacientes con sintomatología compatible a ehrlichiosis, constituyendo éste el primer reporte de infección por *E. canis* en humanos (Pérez *et al.*, 2006).

En el Perú, el diagnóstico de ehrlichiosis es realizado en especies animales, principalmente en caninos (ehrlichiosis canina), siendo muy frecuente la enfermedad en épocas calurosas debido al incremento del número de vectores transmisores de la enfermedad. Recientemente, se ha determinado el potencial zoonótico del agente causal de la ehrlichiosis canina (*Ehrlichia canis*), encontrándose reportes de diversos casos humanos en países sudamericanos (Arraga, 1994; Perez *et al.*, 1996; Tamí *et al.*, 1994), incluso en nuestro país. Se han realizado diversos estudios para hallar seropositividad en individuos con sintomatología sugestiva en otros departamentos, como es el caso de Ancash, donde Anaya y el Instituto Nacional de Salud desarrollaron y estandarizaron una prueba de inmunofluorescencia indirecta para detección de Ig G e Ig Total para el diagnóstico de Ehrlichiosis humana, encontrando seropositividad frente a ésta (Anaya *et al.*, 2009); Moro *et al.*, (2009) realizó un estudio en las tres regiones del país, Costa (Pampas – Lima), Sierra (Cochapata – Cuzco) y Selva (Cura Mori – Iquitos), utilizando también la técnica de Inmunofluorescencia indirecta, además se han realizado estudios en paralelo con éste en Lima – Metropolitana, que buscan hallar seropositividad en individuos, pero este estudio es el primero en realizarse en Médicos Veterinarios y/o individuos que hayan

trabajado con animales con la enfermedad, para hallar seropositividad contra anticuerpos a *E. canis* y/o *E. chaffeensis*.

Este estudio encontró seropositividad en algunos de los individuos participantes, los cuales realizaban actividades veterinarias y/o estuvieron en contacto con animales que sufrieron ehrlichiosis canina. Se encontró 23.33 % de seropositividad contra *E. canis* y un 20 % contra *E. chaffeensis*. Si bien ya se había encontrado seropositividad en individuos con signos inespecíficos, como fiebre en un estudio realizado por Anaya, donde se halló un 9.2 % (12/130) de individuos seropositivos a ehrlichiosis. El presente estudio encontró una seropositividad mayor debido tal vez a que los individuos que participaron en nuestro estudio fueron Médicos Veterinarios y personas las cuales trabajaban constantemente con animales con ehrlichiosis canina y se encontraban en mayor contacto con animales con esta enfermedad. Por lo tanto, los Médicos Veterinarios y/o individuos que trabajan con animales con ehrlichiosis tienen una mayor probabilidad de manifestar seropositividad frente a *E. canis* y/o *E. chaffeensis* y podrían también algunos desarrollar la enfermedad.

La seropositividad hallada contra *E. chaffeensis*, nos hace sospechar de la presencia del agente en nuestro medio, aunque se conoce que *E. chaffeensis* es transmitido por la garrapatas *Amblyoma americanum* y/o *Dermacentor variabilis*, las cuales no se han reportado en el Perú, pero se si han reportado otras especies de *Dermacentor* en animales silvestres como el venado de cola blanca, el cual es fácilmente encontrado en centros recreaciones y zoológicos, pudiendo actuar el venado de cola blanca como reservorio de *E. chaffeensis* como lo hace en otros países. Además de la posibilidad de que otra especie de *Dermacentor* estuviera actuando como vector en nuestro país, no podemos descartar la presencia de la reacción cruzada que existe entre *E. canis* y *E. chaffeensis*, por lo tanto no podemos descartar por medio de la inmunofluorescencia indirecta si la seropositividad hallada para *E. chaffeensis* es producto de la reacción cruzada o si se encuentra también en nuestro medio.

La seropositividad hallada en los individuos participantes contra *E. canis* fue de 23.33 % (21/90) y contra *E. chaffeensis* fue de 20 % (18/90), encontrando una mayor seropositividad contra *E. canis*, pero al realizar la prueba de Chi cuadrado, no se halló diferencia estadísticamente significativa.

Respecto a la seropositividad hallada para *E. canis* en hombres y mujeres fue de 21.8 % (12/55) y 25.7 % (9/35), respectivamente. Se encontró una ligera diferencia entre ambos, pero al

realizar la prueba estadística Chi – cuadrado, se determinó que no existe diferencia estadísticamente significativa, por lo tanto la seropositividad hallada es indistinta al sexo.

La seropositividad hallada para *E. chaffeensis* en hombres y mujeres fue de 18.2 % (10/55) y 22.86 % (8/35), respectivamente, encontrando una ligera diferencia entre ambos, pero al igual que para *E. canis*, al realizar la prueba estadística Chi cuadrado, se llegó a determinar que no existe diferencia estadísticamente significativa, por lo tanto la seropositividad hallada es indistinta al sexo.

VI. CONCLUSIONES

- Este estudio evidencia serológicamente la presencia de anticuerpos contra *Ehrlichia chaffeensis* y *Ehrlichia canis*, en personal que realiza actividades veterinarias en Lima Metropolitana.
- No se encontró asociación del sexo en la seropositividad contra *Ehrlichia chaffeensis* o *Ehrlichia canis* en las muestras procesadas en el presente estudio.

VII. RECOMENDACIONES

- Realizar estudios que evalúen la epidemiología de la ehrlichiosis humana en el Perú, particularmente cuando se conoce que existen casos en perros, con reportes de prevalencia de ehrlichiosis canina de 16% en algunos distritos de Lima (Adrianzen *et al.*, 2003) e incluso hay casos reportados de seropositividad en humanos en Ancash.
- Debemos dar importancia a la ehrlichiosis como diagnóstico diferencial en aquellas enfermedades con sintomatología sugestiva, como, mialgias, fiebre, escalofríos, malestar general, cefalea, entre otras y que no hayan resultado positivos a otra enfermedad o que hayan resultado positivos, pero aún siendo tratados no hay resultados óptimos al tratamiento, ya que la ehrlichiosis puede encontrarse enmascarada.
- Se debe realizar estudios en paralelo que evalúen el grado de asociación entre individuos seropositivos que se dedican a la práctica veterinaria y los individuos que no se dediquen a esto.
- Siendo este hallazgo relevante en el ámbito de la Salud Pública, es importante controlar los casos de ehrlichiosis en animales (control de garrapatas), ya que los caninos domésticos pueden actuar como reservorios para infecciones en humanos.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

1. **Adrianzen, J.; Chávez, A.; Casas, E. C. 2003.** Seroprevalencia de la Dirofilariosis y Ehrlichiosis canina en tres distritos de Lima. Rev. investig. vet. Perú, Vol.14, no.1, p.43-48. ISSN 1609-9117.
2. **Anaya, E.; Morón, C.; Jaramillo, K.; Mendoza L. y Román, R. 2009.** Evidencia serológica de Ehrlichiosis Humana en Ancash – Perú. Rev Perú Med. Exp. Salud pública; 26(1): 54-57
3. **Anderson, B.; Dawson, J. 1991.** *Ehrlichia Chaffeensis*, new specie associated with human Ehrlichiosis. Journal of Clinical Microbiology. 29: 2838-2842.
4. **Anderson, B.; Greene, C.; Jones, D. y Dawson, J. 1992.** *Ehrlichia ewingii*, sp nov., the etiologic agent of canine granulocytic ehrlichiosis. Int. J. Syst Bacteriol 42: 299-302.
5. **Anderson, B. E.; Sims, K. G.; Olson, J. G.; Childs, J. E.; Piesman, J. F.; Happ, C. M.; Maupin, G. O., and Johnson, B. J. 1993.** *Amblyomma americanum*: a potential vector of human ehrlichiosis. Am J Trop Med Hyg. 49(2):239-44.
6. **Arraga – Alvarado, C.; Parra, O.; Palmar, M.; Chango, R. E., and Alvarado, M. C. 1997.** *Ehrlichia platys*: preparación del antígeno y uso de la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) en caninos y humanos. Revista científica FCV – LUZ 7: Supl 2: 99-109.
7. **Arraga – Alvarado, C.; Palmar, M.; Parra, O.; Salas, P. 2003.** *Ehrlichia platys* (*Anaplasma platys*) in dogs from Maracaibo, Venezuela: an ultrastructural study of experimental and natural infections. Vet Pathol. 40:149–156. doi: 10.1354/vp.40-2-149.
8. **Arraga, C. 1994.** Ehrlichiosis humana. Revisión, Investigaciones clin.35: 209-222.

9. **Arraga, C.; Montero, M.; Bernardoni, A.; Anderson, R. y Parra, O. 1996.** Ehrlichiosis humana: reporte del primer caso en Venezuela. (Human Ehrlichiosis: report of the first case in Venezuela). Invest. Clin. 37:35-49.
10. **Artursson, K.; Gunnarsson, A.; Wikstrom, U. B., and Engvall, E. O. 1999.** A serological and clinical follow-up in horses with confirmed equine granulocytic ehrlichiosis. Equine Vet J. 31(6):473-477.
11. **Bakken, J. S.; Krueth, J.; Wilson-Nordskog, C.; Tildes, R. L.; Asanovich, K., and Dumler, J. S. 1996.** Clinical and laboratory characteristics of human granulocytic ehrlichiosis. J Am Med Assoc. 275:199-205.
12. **Bakken, J. S.; and Dumler, J. S. 2000.** Human granulocytic ehrlichiosis. Clin Infect Dis. 31:554-560.
13. **Beaufils, J. P; Inokuma, H.; Martin-Granel, J.; Jumelle, P.; Barbault-Jumell, M.; Brouqui, P. 2002.** *Anaplasma platys* (*Ehrlichia platys*) infection in a dog in France: description of the case and characterization of the agent. Rev Med Vet. 153:85-90
14. **Bool, P. H.; Stumoller, P. 1957.** Ehrlichia case Infections in Dogs on Aruba (Netherlands Antilles). J. Am. Vet. Med. Assoc. 130: 418-420.
15. **Borjesson, D. L.; Simon, S. I.; Hodzic, E.; Ballantyne, C. M., and Barthold, S. W. 2002.** Kinetics of CD11b/CD18 upregulation during infection with the agent of human granulocytic ehrlichiosis in mice. Lab Invest. 82(3):303-311.
16. **Botelho de Castro, M.; Machado, R. Z.; Tomaz de Aquino P. C.; Alessi, A. C., and Costa, M. T. 2004.** Experimental acute canine monocytic erlichiosis; Clinicopathological and immunopathological finfçding. Veterinaria Parasitología 119: 73 – 86.
17. **Breitschwerdt, E. B; Woody, B. J.; Zerbe, C. A.; De Buysscher, E. V., and Barta, O. 1987.** Monoclonal gammopathy associated with naturally occurring canine ehrlichiosis. J Vet Intern Med.; 1(1):2-9.
18. **Breitschewerdt, E. B. 1995.** The rickettsiosis. En: Ettinger, SV, Feldman, EC, ed. Textbook of Veterinary Internal Medicine. Diseases of the Dog and Cat. Saunders. Philadelphia. p 376-383.
19. **Breitschwerdt, E. B.; Hegarty, B. C., and Hancock, S. I. 1998.** Sequential evaluation of dogs naturally infected with *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia ewingii*, or *Bartonella vinsonii*. J. Clin Microbiol.; 36(9):2645-2651.

20. **Breitschewerdt, E. B. 2003.** Canine and feline ehrlichiosis: new developments. 19th Annual Congress of the ESVDECVD. Tenerife, Spain. p 66-71.
21. **Brooks, G. F.; Butel, J. S. y Morse, S. A. 1998.** Microbiología Médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. Appleton & Lauge. 16° ed. p 381.
22. **Brown, W. C.; Brayton, K. A.; Styer, C. M., and Palmer, G. H. 2003.** The hypervariable region of *Anaplasma marginale* major surface protein 2 (MSP2) contains multiple immunodominant CD4+ T lymphocyte epitopes that elicit variant-specific proliferative and IFN- γ responses in MSP2 vaccinates. J Immunol. 170:3790-3798.
23. **Buhles, W. C; Huxsoll, D. L., and Ristic, M. 1974.** Tropical canine pancytopenia: clinical, hematologic, and serologic responses of dogs to *Ehrlichia canis* infection, tetracycline therapy, and challenge inoculation. J Infect Dis. 130:357-367.
24. **Buhles, W. C.; Huxsoll, D. L, and Hildebrandt, P. K. 1975.** Tropical canine pancytopenia: Role of aplastic anaemia in the pathogenesis of severe disease. J Comp Path. 85: 511-21.
25. **Buller, R. S; Arens, M., and Hmiel, S. P. 1999.** *Ehrlichia ewingii*, a newly recognized agent of human ehrlichiosis. N Engl J Med. 341:148-155.
26. **Cadman, H. F.; Kelly, P. J.; Matthewman, L. A.; Zhou, R.; Mason, P. R. 1994.** Comparison of the blot enzyme linked immunoassay with immunofluorescence for detecting antibodies to *Ehrlichia canis*, *Vet. Rec.* 135: 362.
27. **Caldwell, C. W; Everett, E. D., and McDonald, G. 1995.** Lymphocytosis of $\gamma\delta$ T cells in human ehrlichiosis. Am J Clin Pathol. 103:761-766.
28. **Casadevall, A. 1998.** Antibody-mediated protection against intracellular pathogens. Trends Microbiol. 6:102-107.
29. **Chavera, A.; Viera, F. y Samamé, H. 1982.** Ehrlichiosis Canina en el Perú. Anales del VII Congreso Nacional de Ciencias Veterinarias, Ica – Perú.
30. **Chen. S.; Dumler, J.; Walker, D. 1994.** Identification of granulocytotropic Ehrlichia spp. as the etiologic agent of human disease. Journal of Clinical Microbiology, 32: 589-595.
31. **Codner, E. y Farris-Smith, L. 1986.** Characterization of the subclinical phase of ehrlichiosis in dogs. J Am Vet Med Ass. 189:47-50.
32. **Codner, E. y Farris-Smith, L. 1989.** Characterization of the sub clinical phase of Ehrlichiosis on dogs, Am. J. Vet. Res. 50: 1544

33. **Codner, E. and Maslin, W. 1992.** Investigation of renal protein loss in dogs with acute experimentally induced *Ehrlichia canis* infection. Am. J. Vet. Res. 53(3):264-269.
34. **Cohn L.A. 2003.** Ehrlichiosis and related infections. Vet Clin North Am. Small Anim Pract. 33:863-884.
35. **Contreras, A.; Gavidia, C.; Li, O.; Díaz, D. y Hoyos, L. 2009.** Estudio retrospectivo de caso-control de Ehrlichiosis canina en la facultad de medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos: periodo 2002-2005. Rev Inv Vet Perú; 20 (2): 270-276.
36. **Dagnone, A. S.; De Moraes, H.; Vidotto, M., Jojina, F.S.; Vidotto, O. 2003.** Ehrlichiosis in anemic, thrombocytopenic, or tick-infested dogs from a Hospital population in South Brazil. Journal of Veterinary Internal Medicine, 17:422-3.
37. **Dawson, J.; Anderson, B.; Fishbeid, D.; Sanchez, J. 1991.** Isolation and characterization of an Ehrlichia spp. from a patient diagnosed with human ehrlichiosis. Journal of Clinical Microbiology. 29:2741-2745.
38. **Dib, K. 2000.** BETA 2 integrin signalling in leukocytes. Front Biosci. 5:438-451.
39. **Donatien, A. ; Lestoquard, F. 1935.** Existence en Algérie d'une rickettsia du chien. Bulletin de la Société de Pathologies Exotique, 28:418-419.
40. **Dumler, J. S.; Asanovich, K. M., and Bakken, J. S. 1995.** Serologic cross reaction among *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia phagocytophila*, and human granulocytic *ehrlichia*. J Clin Microbiol. 33(5):1098-1103.
41. **Dumler, J.; Barbet, A.; Bekker, C.; Dash, G.; Palmer, G. H; Ray, S. Rikihisa, Y., and Rurangirwa, F. R. 2001.** Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and "HGE agent" as a subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology; 51:2145-2165.
42. **Eng, T. R; Harkess, J. R., and Fishbein, D. B. 1990.** Epidemiologic, clinical and laboratory findings of human ehrlichiosis in the United States. 264:2251-2258.
43. **Ettinger, S. J. 1992.** Tratado de Medicina Interna. Enfermedades del perro y del gato. Inter – medica p 297-299

44. **Everett, E. D.; Evans, K. A.; Henry, B., and McDonald, G. 1994.** Human ehrlichiosis in adults after tick exposure. *Ann Intern Med.* 120:730-735.
45. **Ewing, S. 1963.** Observations on leukocytic inclusion bodies from dogs infected with *Babesia canis*. *Journal of the American Veterinary Medical Association.* 143:503-506.
46. **Ewing, S. 1969.** Canine Ehrlichiosis. *Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine.* 13:331-353.
47. **Ewing, S.; Robertson, W.; Buckner, R. 1971.** A new strain of *Ehrlichia canis*. *Journal of American Veterinary Medical Association.* 159, 12: 1771-1774.
48. **Feng, H. M., and Walker, D. H. 2004.** Mechanisms of Immunity to *Ehrlichia muris*: a Model of Monocytotropic Ehrlichiosis. *Infect Immun.* 72(2):966-971.
49. **Frank, J. R., and Breitschwerdt, E. B. 1999.** A retrospective study of ehrlichiosis in 62 dogs from North Carolina and Virginia. *J Vet Int Med.* 13(3):194-201.
50. **Fishbein, D.; Dawson, J.; Robinson, L. 1994.** Human ehrlichiosis in the United States. 1985 to 1990. *Annals of Internal Medicine,* 120:736-743.
51. **Gelatt, K.N. 1991.** Canine anterior uvea. En: *Veterinary Ophthalmology.* Gelatt K.N. (ed). Lea and Febiger. Philadelphia. 374-375.
52. **Gershwin L. J.; Krakowka, S.; Olsen, R. G. 1995.** Cytokines. In: *Immunology and immunopathology of domestic animals*, 2nd ed. Mosby, St. Louis, p 40–46.
53. **Goldman, E.; Breitschwerdt, E. B., and Grindem, C. B. 1998.** Granulocytic ehrlichiosis in dogs from North Carolina and Virginia. *J Vet Intern Med.* 12(2):61-70. EMC
54. **Greene, R. T. 1997.** Ehrlichiosis canina: Implicaciones clínicas de factores humorales. En: Kirk, ed. *Terapéutica veterinaria de pequeños animales.* 12 va ed. Mc Graw – Hill interamericana. México. p 317 – 320.
55. **Grindem, C. B.; Breitschwerdt, E. B.; Perkins, P. C; Cullins, L. D.; Thomas, T. J., and Hegarty, B. C. 1999.** Platelet associated immunoglobulin (antiplatelet antibody) in canine Rocky Mountain spotted fever and ehrlichiosis. *J Am Anim Hosp Assoc.* 35(1):56-61.
56. **Harrus, S.; Waner, T., Avidar, Y.; Bogin, E.; Peh, H., and Bark, H. 1996a.** Serum protein alterations in canine ehrlichiosis. *Vet Parasitol.* 66(3-4):241-249
57. **Harrus, S.; Waner, T.; Weiss, D. J.; Keysary, A., and Bark, H. 1996b.** Kinetics of serum antiplatelet antibodies in experimental acute canine ehrlichiosis. *Vet Immunol Immunopathol.* 51(1-2):13-20.

58. **Harrus, S.; Aroch, I.; Lavy, E., and Bark, H. 1997.** Clinical manifestations of infectious canine cyclic thrombocytopenia. *Vet Rec.* 141(10):247-250.
59. **Harrus, S.; Ofri, R.; Aizenberg, I., and Waner, T. 1998a.** Acute blindness associated with monoclonal gammopathy induced by *Ehrlichia canis* infection. *Vet Parasitol.*; 78(2):155-160.
60. **Harrus, S., Waner, T.; Keysary, A.; Voet, I. H., and Bark, H. 1998b.** Investigation of splenic functions in canine monocytic ehrlichiosis. *Vet Immunol Immunopathol.* 62:15-27.
61. **Harrus, S.; Waner, T.; Bark, H.; Jongejan, F., and Cornelissen, C, A. 1999.** Recent advances in determining the pathogenesis of canine monocytic ehrlichiosis. *J Clin Microbiol.* 37(9):2745-2749.
62. **Harvey, J. W.; Simpson, C. F.; Gaskin, J. M. 1978.** Cyclic thrombocytopenia induced by a rickettsia-like agent in dogs. *Journal of infec. Dis.* 137: 182 – 188.
63. **Harvey; J. W. 2000.** Ehrlichiosis monocítica y granulocítica caninas. En: G. E. Greene, ed. *Enfermedades infecciosas en perro y gatos- Mc. Graw – Hill Interamericana México.* p 162-164.
64. **Hoskins, J. D. 1991.** The brown dog tick. *Vet Clin North Am. Small Anim Pract.* 21(1):99-101.
65. **Huxsoll, D. 1990.** The historical background and global importance of Ehrlichiosis. En: Williams, J. C.; Kakoma, I., ed. *Ehrlichiosis. A vector borne-disease of animal and man.* Kluwer Academical Publishers. p. 1-8.
66. **Iqbal, Z.; Chaichanasiriwithaya, W., and Rikihisa, Y. 1994.** Comparison of PCR with other tests for early diagnosis of canine ehrlichiosis. *J Clin Microbiol.* 32(7):1658-1662.
67. **Johnson, E. M.; Ewing, S. A.; Barker, R. W.; Fox, J. C.; Crow,D. W.; Kocan, K. M. 1998.** Experimental transmission of *Ehrlichia canis* Ehrlichieae by *Dermacentor variabilis*, Ixodidae. *Vet Parasitol.* 277-288.
68. **Kaylor, P. S.; Crawford, T. B.; McElwain, T. F., and Palmer, G. 1991.** Passive transfer of antibody to *Ehrlichia risticii* protects mice from ehrlichiosis. *Infect Immun.* 59(6):2058-2062.
69. **Keefe, T.; Holland, C.; Salyer, P.E., and Ristic, M. 1982.** Distribution of *Ehrlichia canis* among military working dogs in the world and selected civilian dogs in the United States. *JAVMA.* 181:236-238.

70. **Kitron, U., and Kazmierczak, J. 1997.** Spatial analysis of the distribution of Lyme disease in Wisconsin. *Am J Epidemiol.* 145:558-566.
71. **Klein, M.B.; Hu, S.; Chao, C. G., and Goodman J. L. 2000.** The agent of human granulocytic ehrlichiosis induces the production of myelosuppressing chemokines without induction of proinflammatory cytokines. *J Infect Dis.* 41(6):263-265.
72. **Kontos, V.; Papadopoulos, O.; French, T. W. 1991.** Natural and experimental canine infections with a Greek strain of *Ehrlichia platys*. *Vet Clin Pathol.* 20:101–105. [[PubMed](#)]
73. **Laboratorio Arriaga. 2004.** La ehrlichiosis en el hombre: una infección emergente. Clínica Kennedy. Guayaquil, Ecuador. 2004.
74. **Li, J.; Yager, E.; Reilly, M.; Freeman, C.; Reddy, G. R.; Chu, F.K., and Winslow, G. 2001.** Outer membrane protein specific monoclonal antibodies protect SCID mice from fatal infection by the obligate intracellular bacterial pathogen *Ehrlichia chaffeensis*. *J. Immunol.* 166:1855-1862.
75. **Li, O., Diaz del Olmo. J.; Fernandez, V.; Hoyos, L.; Moro, M. 2005.** Primer Reporte de ehrlichiosis granulocítica canina. I Congreso CANFELEX.
76. **López, J.; Castillo, A.; Muñoz, M.; Hildebrandt, S. 1999.** Hallazgo de *Ehrlichia canis* en Chile, informe preliminar. Valdivia. *Arch. med. vet.* vol.31, N° 2 pp. 211-214.
77. **López, J.; Rivera, M.; Concha, J. 2003.** Ehrlichiosis humana en Chile, evidencia serologica. *Rev. Med. Chile.* 131, 67-70.
78. **Maeda, K.; Markowitz, N.; Hawley, R.; Ristic, M. 1987.** Human infection with *Ehrlichia canis*, a leukocytic rickettsia. *New England Journal of Medicine.* 316, 853-856.
79. **Magnarelli, L. A. and Anderson, J. F. 1993.** Serologic evidence of canine and equine ehrlichiosis in north-eastern United States. *J Clin Microbiol.* 31(11):2857-2860.
80. **Marty, A.; Dumler, J., and Imes, G. 1995.** Ehrlichiosis mimicking thrombotic thrombocytopenic purpura: case report and pathological correlation. *Hum Pathol.* 26:920-925.
81. **Messick J., and Rikihisa Y. 1993.** Characterization of *Ehrlichia risticii* binding, internalization, and proliferation in host cells by flow cytometry. *Infect Immun.* 61(9):3803-3810.

82. **Messick J., and Rikihisa Y. 1994.** Inhibition of binding, entry or intracellular proliferation of *Ehrlichia risticii* in P388D1 cells by anti-*E. risticii* serum, immunoglobulin G or Fab fragment. Infect Immun. 62(8):3156-3161.
83. **Misao, T.; Kobayashi, Y. 1955.** Studies on infectious mononucleosis (glandular fever). Isolation of etiologic agent from blood, bone marrow and lymph node of patients with infectious mononucleosis using mice. Kiushu J. Med. Sci., 6, 145-152.
84. **Moro, P.; Shah, J.; Li, O.; Gilman, R. H.; Harris, N., and Moro, M. 2009.** Short Report: Serologic Evidence of Human Ehrlichiosis in Peru. Am. J. Trop. Med. Hyg., 80(2), pp. 242–244
85. **Moshkovski, S. D. 1945.** Cytotropic inducers of infection and the classification of the *Rickettsiae* with *Clamydozoa*. Adv Mod Biol (Moscow). 19:1-44.
86. **Murphy, G. L; Ewing, S. A.; Whitworth, L. C.; Fox, J. C., and Kocan, A. A. 1998.** A molecular and serologic survey of *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis* and *E. ewingii* in dogs and ticks from Oklahoma. Vet Parasitol. 79:325-339.
87. **Neer, T. 2000.** Ehrlichiosis monocítica y granulocítica caninas. En: G. E. Greene, ed. Enfermedades infecciosas en perro y gatos. Mc. Graw – Hill Interamericana México. p 153-162
88. **Nyindo, M., Huxsoll, D. L.; Ristic, M., Kakoma, I.; Brown, J.; Carson, C. A., and Stephenson, E. H. 1980.** Cell – mediated and humoral immune responses of german shepherd dogs and beagles to experimental infection with *Ehrlichia canis*. Am. J. Vet. Res. 41:250-254.
89. **Paddock, C. D.; Suchard, D. P.; Grunbach, K. L.; Hadley, W. K.; Kerschmann, R.; Abbey, N.; Dawson, J.; Anderson, B.; Sims, K.; Dumler, J., and Herndier, B. 1993.** Brief report: fatal seronegative ehrlichiosis in a patient with HIV infection. N Engl J Med. 1164-1167.
90. **Paddock, C. D.; Sumner, J. W.; Shore, M.; Bartley, D. C.; Elie, D. C.; Mcquade, J. G.; Martin, C. R.; Goldsmith, C. S., and Childs, J. E. 1997.** Isolation and characterization of *Ehrlichia chaffeensis* strains from patients with fatal ehrlichiosis. J Clin Microbiol. 35:2496-2502.
91. **Paddock, C. D.; Folk, S. M.; Shore, G. M.; Machado, L. J.; Huycke, M.; Slater, L.; Liddell, A.; Buller, R.; Storch, G.; Monson, T.; Rimland, D.; Sumner, J.; Singleton, J.; Bloch, K.; Tang, Y.; Standaert, S., and Childs, J. 2001.** Infections with *Ehrlichia*

- chaffeensis* and *Ehrlichia ewingii* in persons coinfecting with human immunodeficiency virus. Clin Infect Dis. 33(4):1586-1594.
92. **Paddock, C. D. and Childs, J.E. 2003.** *Ehrlichia chaffeensis*: a prototypical emerging pathogen. Clin Microbiol Rev. 16(1):37-64.
 93. **Park, J. and Rikihisa, Y. 1991.** Inhibition of *Ehrlichia risticii* infection in murine peritoneal macrophages by gamma interferon, a calcium ionophore, and concanavalin A. Infect Immun. 59(10):3418- 3423.
 94. **Parnell, N. 2004.** Ehrlichiosis canina. En Morgan, RV, ed. Clínica de Pequeños Animales. El SEVIER. España. p 1122-1124
 95. **Patel, R. G., and Byrd, M. A. 1999.** Near fatal acute respiratory distress syndrome in a patient with human ehrlichiosis. South Med J. 92(3):333-335.
 96. **Pennisi, M. 1989.** Ehrlichiosis canina. Animalis familiaris. Vol.4, No.1, p.11-16.
 97. **Pérez, M.; Rikihisa, Y.; Wen, B. 1996.** *Ehrlichia canis*-like agent isolated from a man in Venezuela: Antigenic and genetic characterization. J Clin Microbiol; 34: 2133-2139.
 98. **Perez, M.; Boodor, M.; Zhang, C.; Xiong, Q.; Rikihisa, Y. 2006.** La infección humana con *Ehrlichia canis* acompañada de signos clínicos en Venezuela. [Annals of the New York Academy of Sciences](#), Vol 1078, Num.1. p.110-117(8) 110-117 (8)
 99. **Perterson, L. R.; Sawyer, L. A.; Fishbein, D. B.; Kelley, P. W.; Thomas, R. J.; Magnarelli, L. A.; Redus, M., and Dawson, J. E. 1989.** An outbreak of ehrlichiosis in members of an army reserve unit exposed to ticks. J Infect Dis. 159:562-568.
 100. **Petrovec, M.; Lotric, S., and Avsic, T. 1997.** Human disease in Europe caused by a granulocytic *Ehrlichia* species. J Clin Microbiol. 35:1556-1559.
 101. **Reardon, M. J., and Pierce, K. 1981.** Acute experimental canine ehrlichiosis. Vet. Pathol. 18:48-61.
 102. **Reddy, G. R.; Sulsona, C. R.; Barbet, A. F.; Mahan, S. M.; Burrridge, M. J., and Alleman, A. R. 1998.** Molecular characterization of a 28 kDa surface antigen gene family of the tribe *Ehrlichiae*. Biochem Biophys Res Commun. 247(3):336-343. Rikihisa, Y. The tribe *Ehrlichiae* and ehrlichial diseases. Clin Microbiol Rev. 1991; 4:286-308.
 103. **Rikihisa, Y. 1991.** The tribe *Ehrlichiae* and ehrlichial diseases. Clin Microbiol Rev. 4:286-308.

104. **Ristic, M., and Kreier, J. P. 1957.** Family III. *Anaplasmataceae* Philip, 980AL. En: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 1984. Vol. 1. Edited by N.R. Krieg y J.G. Holt. Baltimore: Williams y Wilkins. p 719-729.
105. **Ristic, M., and Holland, C. J. 1993.** Canine ehrlichiosis. En: Woldehiwet, R, ed. Rickettsial and Chlamydial. Diseases of Domestic Animals. Pergamon Press, Oxford, United Kingdom. p 169-186.
106. **Rohrbach, B. W.; Harkess, J. R.; Ewing, S. A.; Kudlac, J.; Mckee, G. L., and Istre, G. R. 1990.** Epidemiologic and clinical characteristics of persons with serologic evidence of *E. canis* infection. Am J Pub Health. 80:442-445.
107. **Roitt, I. 1998.** La base de la inmunología: Inmunidad innata e Inmunidad adquirida específica. En: Roitt, I., eds. Inmunología Fundamentos. Editorial Médica Panamericana. p 3-39.
108. **Sadikot, R.; Shaver, M. J., and Reeves, W. B. 1999.** *Ehrlichia chaffeensis* in a renal transplant recipient. Am J Nephrol. 19:674-676.
109. **Sainz, A. 1996.** Aspectos clínicos y epizootológicos de la ehrlichiosis canina. Estudio comparado de la eficacia terapéutica de la doxiciclina y el dipropionato de imidocarb. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid (Ed).
110. **Sainz, A., Amusatogui, I.; Rodríguez, F.; Tesouro, M. A. 2000.** La Ehrlichiosis en el perro: presente y futuro.
111. **Saito, T. B.; Cunha-Filho, N. A.; Pacheco, R. C.; Ferreira, F.; Pappen, F. G.; Farias, A. R.; Larsson, C. E., and Labruna, M. B. 2008.** Canine Infection by Rickettsiae and Ehrlichiae in Southern Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 79(1), p. 102–108.
112. **San Miguel, S. Y. 2006.** Prevalencia de *Ehrlichia canis* en caninos de la provincia de Sullana. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Universidad Alas Peruanas. p 51.
113. **Sellon, R.K. 2003.** Update on molecular techniques for diagnostic testing of infectious disease Vet Clin North Am Small Anim Pract. 33(4):677-693.
114. **Sloand, E. M.; Klein, H. G., and Banks, S. M. 1992.** Epidemiology of thrombocytopenia in HIV infection. Eur J Haematol. 48:168-172.
115. **Sumner, J. W.; Nicholson, W. L., and Massung, R. F. 1997.** PCR amplification and comparison of nucleotide sequences from the *groESL* heat shock operon of *Ehrlichia* species. J Clin Microbiol. 35:2087-2092.

116. **Tamí, I.; García, F.; Tamí, M.; Arcia, R. 1994.** Ehrlichiosis en animales y humanos en Venezuela. Acta Científica de la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas (SVBE). 3:1924.
117. **Tamí, I.; Jordan, L. 2002.** Identificación de mórulas de Ehrlichia en plaquetas de sangre humana en Venezuela. Antibiótico e Infección. 10(3):1238.
118. **Tizard, I. 1998.** Inmunología Veterinaria. 5ª ed. México; McGraw-Hill. P 22, 103.
119. **Theis, J. H., and Budwiser, P.D. 1997.** *Rhipicephalus sanguineus*: sequential histopathology at the host-arthropod interface. Exp Parasitol. 1997; 36(1):77-105.
120. **Thomas, V.; Anguita, J.; Barthold, S. W., and Fikrig, E. 2001.** Coinfection with *Borrelia burgdorferi* and the Agent of Human Granulocytic Ehrlichiosis Alters Murine Immune Responses, Pathogen Burden, and Severity of Lyme Arthritis. Infection and Immunity. Vol. 69, No. 5. p 3359-3371.
121. **Troy, G. C.; Vulganot, J. C., and Turnwalt, G. H. 1980.** Canine ehrlichiosis: a retrospective study of 30 naturally occurring cases. J Am Anim Hosp Assoc. 16:181-187.
122. **Ueno, T. E.; Aguiar, D. M.; Pacheco, R. C.; Richtzenhain, L. J.; Ribeiro, M. G.; Paes, A. C.; Megid, J., and Labruna, M. B. 2009.** *Ehrlichia canis* em cães atendidos em hospital veterinário de Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil. Rev. Bras. Parasitol. Vet., Jaboticabal, v. 18, n. 3, p. 57-61.
123. **Unver, A.; Perez, M.; Orellana, N.; Huang, H., and Rkihisa, Y. 2001.** Molecular and antigenic comparison of *Ehrlichia canis* isolates from dogs, ticks and a human in Venezuela. J Clin Microbiol. 39(8):2788-2793.
124. **Vinasco, J., Li, O.; Alvarado, A.; Diaz, D.; Hoyos, L.; Tabacchi, L.; Sirigireddy, K.; Ferguson, C., and Moro, M. H. 2007.** Molecular Evidence of a New Strain of *Ehrlichia canis* from South America. 45: 2716-2719.
125. **Vugia, D. J., and Kramer, V. L. 1996.** A human case of monocytic ehrlichiosis with adult respiratory distress syndrome in northern California. West J Med. 164(6):525-528.
126. **Waner, T.; Harrus, S.; Weiss, D. J.; Bark, H., and Keysary, A. 1995.** Demonstration of serum antiplatelet antibodies in experimental acute canine ehrlichiosis. Vet Immunol Immunopathol. 48(1-2):177-182.

127. **Waner, T.; Harrus, S.; Bark, H.; Bogin, E.; Avidar, Y.; Keysary, A. 1997.** Characterization of the subclinical phase of canine ehrlichiosis in experimentally infected beagle dogs. *Veterinary Parasitology*, 69 (3-4), p. 307-317.
128. **Waner, T. y Harrus, S. Ehrlichiosis monocítica canina. 2000.** En: Carmichael, L, ed. Recent Advances in Canine Infectious Diseases. Publisher: International Veterinary Information Service (www.ivis.org), Ithaca, New York, USA.
129. **Waner, T.; Leykin, I.; Shinitzky, M.; Sharabani, E.; Buch, H.; Keysary, A.; Bark, H., and Harrus, S. 2000.** Detection of platelet-bound antibodies in beagle dogs after artificial infection with *Ehrlichia canis*. *Vet Immunol Immunopathol*. 77:145-150.
130. **Wayne, Daniel. 1996.** Bioestadística. Ed. LIMUSA. México. P. 206.
131. **Weiser, M. G.; Thrall, M. A., and Fulton, R. 1991.** Granular lymphocytosis and hyperproteinemia in dogs with cronic ehrlichiosis. *J Am Anim Hosp Assoc*. 27:84-88.
132. **Williams, N. M.; Cross, R. J., and Timoney, P. J. 1994.** Respiratory burst activity associated with phagocytosis of *Ehrlichia risticii* by mouse peritoneal macrophages. *Res Vet Science*. 57(2):194-199.
133. **Wilkins, J.; Bowdwn, R.; Wilkinson, G. 1967.** A new canine disease syndrome. *Veterinary Record*, 81, 57-58
134. **Winslow, G. M.; Yager, E.; Shilo, K.; Volk, E.; Reilly, A., and Chu, F. K. 2000.** Antibody-mediated elimination of the obligate intracellular bacterial pathogen *Ehrlichia chaffeensis* during active infection. *Infect Immun*. 2187-2195.
135. **Wolf, L.; McPherson, T.; Harrison, B.; Engber, B.; Anderson, A., and Whitt, P. 2000.** Prevalence of *Ehrlichia ewingii* in *Amblyomma americanum* in North Carolina. *J Clin Microbiol*. 38:2795.
136. **Wong, S. J., and Thomas, J. A. 1998.** Cytoplasmatic, Nuclear and platelet autoantibodies in human granulocytic ehrlichiosis patients. *J Clin Microbiol*. 1959-1963.
137. **Woody, B. J., and Hoskins, J. D. 1991.** Ehrlichial diseases of dogs. *Vet Clin North Am. Small Anim Pract*. 21(1):75-98.
138. **Yager, E.; Bitsaktsis, C.; Nandi, B.; McBride, J. W. and Winslow, G. Dec 2005.** Essential Role for Humoral Immunity during *Ehrlichia* Infection in Immunocompetent Mice *Infect. Immun*; 73: 8009 - 8016.

139. **Yu, X.; McBride, J. W.; Diaz, C. M., and Walker, D. H. 2000.** Molecular cloning and characterization of the 120- kilodalton protein gene of *Ehrlichia canis* and application of the recombinant 120-kilodalton protein for serodiagnosis of canine ehrlichiosis. J Clin Microbiol. 38(1):369-374.